

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

In vitro saturačné štúdie

^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu na SKOV3

bunkách.

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce : Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Juliána Klimová

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a zdroje z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá ku získaniu iného či rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 14.5.2018

Juliána Klimová

PodĎakovanie

Veľmi rada by som sa poďakovala v prvom rade svojmu školiteľovi Mgr. Pavlovi Bártovi, PhD. za jeho odborné vedenie, predanie cenných rad, trpezlivosť a všetok jeho drahocenný čas, ktorý mi venoval v priebehu spracovania celej mojej diplomovej práce. Takisto by som sa veľmi rada poďakovala celému oddeleniu Radiofarmak za ich priateľský prístup. V neposlednom rade moje veľké poďakovanie patrí mojej rodine za podporu a pomoc v priebehu celého mojho štúdia.

Abstrakt v slovenskom jazyku

Univerzita Karlova v Prahe

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra fyziky a fyzikálnej chémie

Študentka: Juliána Klimová

Školiteľ: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Názov diplomovej práce: In vitro saturačné štúdie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na SKOV3 bunkách.

Pasívna imunoterapia spočíva v podávaní už hotových výkonných tzv. efektorových zložiek imunitného systému (monoklonálne protilátky), ktoré v organizme plnia svoju funkciu v rámci likvidácie nádorovej bunky. Aktívna imunoterapia sa snaží vhodnou formou imunizácie vyvolať u pacienta účinnú protinádorovú odpoveď. Po naviazaní monoklonálnej protilátky na nádorovú bunku sa takáto bunka stáva značeným terčom pre následnú likvidáciu. Zvýšiť protinádorový účinok monoklonálnych protilátok je možné tým, že sa na ne naviažu cytostatiká, toxíny alebo rádioaktívne nuklidy.

Predkladaná diplomová práca sa zamerala na rádioaktívne značenie monoklonálnej protilátky ramucirumab cielenej na receptor pre vaskulárny endoteliálny faktor typu 2 (VEGFR-2), ktorý je hojne prítomný na bunkách niektorých typov nádorových ochorení. V rámci experimentálnej práce sa vykonala najprv konjugácia chelatačného činidla succinimidyl-6-hydrazino-nicotinamidu (HYNIC) na monoklonálnu protilátku, následne sa naviazal radionuklid ^{99m}Tc na predom pripravený konjugát chelátor-protilátka a takto pripravené radiofarmakum ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab sa ďalej podrobilo testovaniu. Radiochemická čistota pripraveného radiofarmaka a kvalita radioaktívneho značenia bola meraná pomocou metód HPLC a iTLC. Schopnosť protilátky sa viazať na cieľový VEGFR-2 bola otestovaná *in vitro* pomocou saturačnej štúdie či už s využitím manuálnej techniky alebo pomocou automatickej radioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase, kedy sa v oboch prípadoch stanovovala rovnovážná disociačná konštanta K_D .

Radiochemická čistota pripraveného radioimunokonjugátu bola vždy vyššia ako 95 %. Výsledné hodnoty K_D rádioaktívne značenej monoklonálnej protilátky ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab boli 3,52 nM pre automaticku radioimunoanalýzu a 11,23 nM pre manuálnu techniku.

Výsledky merania tak potvrdili vhodnosť metódy radioaktívneho značenia monoklonálnej protilátky ramucirumab použitým radionuklidem. V prípade úspešného *in vivo* testovania by pripravené radiofarmakum mohlo umožniť vizualizáciu nádorových ochorení charakterizovaných prítomnosťou VEGFR-2.

Abstrakt v anglickom jazyku

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Student: Juliána Klimová

Supervisor: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Name of the work: In vitro saturation study of ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab on SKOV3 cell line.

The passive immunotherapy is based on the use of already active immune system components (monoclonal antibodies), which play an important role in cancer cells elimination in the organism. The active immunotherapy tries to stimulate an active anticancer response via an appropriate form of an immunization. When monoclonal antibodies bind to cancer cells, those cells become a selected target for the following removal. The enhancement of the anti-cancer affect of monoclonal antibodies is possible due to the attachment of therapeutic agents like cytostatics, toxins and radionuclides.

This presented master thesis is focused on the radiolabeling of the monoclonal antibody ramucirumab, which is directed against the vascular endothelial growth factor type 2 (VEGFR 2), which is often present in cells of some types of cancerous diseases. Within the experimental work, at first, there was a conjugation of chelating agent succinimidyl-6-hydrazino-nicotinamide (HYNIC) on the monoclonal antibody. After this step, radionuclide ^{99m}Tc was attached on the previously prepared immunoconjugate chelator-antibody and this prepared radiopharmaceutical ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab was further tested. The radiochemical purity of the radiopharmaceutical and the quality of the radioactive labeling was measured with the employment of the methods HPLC and iTLC. The functionality of the radiolabeled antibody to bind to the targeted VEGFR-2 was scrutinized *in vitro* with the help of the case studies using either the manual saturation technique or with the help of the automated real-time radioimmunoassay, where in the both cases the equilibrium dissociation constant K_D was determined.

The radiochemical purity of the prepared radioimmunoconjugate was always more than 95 %. The resulting K_D values of ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab were 3.52 nM for the automated real-time radioimmunoassay and 11.23 nM for the manual technique.

The found results confirmed the suitability of the employed radiolabeling method of the monoclonal antibody ramucirumab with the used radionuclide. The prepared radiopharmaceutical could be intended for the VEGFR-2 positive cancer disease imaging in the case of successful results for its *in vivo* testing.

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Zoznam použitých skratiek | 11 |
| 2 | Úvod a cieľ | 13 |
| 3 | Teoretická časť | 15 |
| 3.1 | Imunitný systém a monoklonálne protilátky | 15 |
| 3.1.1 | História..... | 15 |
| 3.1.2 | Príprava monoklonálnych protilátok | 17 |
| 3.1.3 | Technológie pre meranie fyzikálnych charakteristik protilátok | 19 |
| 3.2 | Angiogenéza, VEGF rodina a jej receptory | 20 |
| 3.3 | Väzbové testy..... | 24 |
| 3.3.1 | Testy s monoklonálnou protilátkou na mikrotitračnej dosťičke..... | 24 |
| 3.3.2 | Test hemaglutinácie | 25 |
| 3.4 | Analytické procesy čistenia protilátok..... | 25 |
| 3.4.1 | Elektroforetické technológie pre identitu, čistotu a integritu protilátok: 26 | |
| 3.5 | Imunitný systém v boji proti nádorom..... | 27 |
| 3.5.1 | Antigény tumoru a imunogenicita | 28 |
| 3.5.2 | Fungovanie proteínovej terapie | 28 |
| 3.5.3 | Možné príčiny nefungujúcej protinádorovej liečby pomocou protilátok 29 | |
| 3.5.4 | Špeciálne antigény | 30 |
| 3.6 | Terapia nádorového ochorenia monoklonálnymi protilátkami..... | 31 |
| 3.6.1 | Bunková cytotoxicita závislá na protilátkach | 32 |
| 3.6.2 | Cytotoxicita závislá na komplemente | 32 |
| 3.6.3 | Ďalšie solídne nádorové antigény | 32 |
| 3.6.4 | Molekulárna diagnostika, prediktívne biomarkery a rezistencia voči liekom | 33 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.7 | Monoklonálna protilátka Ramucirumab | 35 |
| 3.7.1 | Klinické štúdie účinku mAb Ramucirumab..... | 35 |
| 3.7.2 | Štúdia na účinky, farmakodynamiku, farmakokinetiku a vplyv ramucirumabu na sérové biomarkery u solidných nádorov | 36 |
| 3.8 | Biosenzory pre in vitro diagnostiku nádorových ochorení | 37 |
| 3.8.1 | Kolorimetrické biosenzory bez premývania | 38 |
| 3.8.2 | Fluorescentné biosenzory bez premývania | 39 |
| 3.8.3 | Chemiluminiscentné biosenzory bez premývania | 39 |
| 3.9 | Nukleárna fyzika v diagnostike a liečbe nádorov | 39 |
| 3.9.1 | Protonoterapia | 41 |
| 3.9.2 | PET a SPECT..... | 42 |
| 3.10 | Nepriame radioaktívne značenie monoklonálných protilátok za použitia chelatačného činidla HYNIC | 44 |
| 3.10.1 | Koligandy radioaktívneho značenia cez chelátor HYNIC..... | 45 |
| 4 | Experimentálna časť | 47 |
| 4.1 | Prístroje a software | 47 |
| 4.2 | Použitý material | 48 |
| 4.3 | Použité chemikálie..... | 48 |
| 4.4 | Použitý biologický material | 49 |
| 4.5 | Pracovný postup..... | 49 |
| 4.5.1 | Príprava citratového pufru | 49 |
| 4.5.2 | Príprava fosfátového pufru | 49 |
| 4.5.3 | Príprava Krebs-Ringerovho roztoku..... | 50 |
| 4.5.4 | Kultivácia bunkových línií SKOV3..... | 50 |
| 4.5.5 | Konjugácia HYNIC s ramucirumabom | 50 |
| 4.5.6 | ^{99m} Tc značenie konjugátu HYNIC-ramucirumab | 51 |
| 4.5.7 | Stanovenie radiochemickej čistoty pomocou HPLC | 51 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.5.8 | Stanovenie radiochemickej čistoty pomocou iTLC..... | 52 |
| 4.5.9 | Meranie väzby rádioligandu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na VEGFR 2 pomocou radioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase..... | 52 |
| 4.5.10 | Saturačná štúdia ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pomocou ručnej metódy | 55 |
| 5 | Výsledky | 57 |
| 5.1 | Stanovenie radiochemickej čistoty HPLC metódou | 57 |
| 5.2 | Zisťovanie čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab metódou iTLC | 59 |
| 5.3 | Meranie väzby rádioligandu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na VEGFR-2 pomocou radioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase..... | 62 |
| 5.4 | Saturačné štúdie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pomocou ručnej metódy..... | 63 |
| 6 | Diskusia | 66 |
| 7 | Záver | 70 |
| 8 | Zoznam literatúry..... | 72 |

1 Zoznam použitých skratiek

| | |
|--------------|---|
| ADCC | bunková cytotoxicita závisla na protilátkach, <i>angl.</i> antibody-dependent cellular cytotoxicity |
| AUC | plocha pod krivkou, <i>angl.</i> area under the curve |
| BFC | bifunkčný chelátor, <i>angl.</i> bifunctional chelators |
| BOC | kyselina butoxykarbonylova |
| BSA | hovädzí sérový albumin, <i>angl.</i> Bovine serum albumin |
| ca | karcinóm, <i>angl.</i> carcinoma |
| CDC | cytotoxicita závisla na komplemente, <i>angl.</i> Complement-dependent cytotoxicity |
| CI | klírens, <i>angl.</i> clearance |
| CL | chemiluminiscencia, <i>angl.</i> chemiluminescent |
| CT | počítačová tomografia, <i>angl.</i> Computed Tomography |
| DMF | dimethylformamid, <i>angl.</i> Dimethylformamide |
| EC | endoteliálne bunky, <i>angl.</i> endothelial cells |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová, <i>angl.</i> Ethylenediaminetetraacetic acid |
| FBS | fetálne bovinné sérum, <i>angl.</i> Fetal bovine serum |
| FDA | Úrad pre kontrolu potravín a liečiv, <i>angl.</i> Food and Drug Administration |
| HAMA | ľudské protilátky proti myšacím, <i>angl.</i> human anti-mouse antibodies |
| HER | receptor pre ľudský epidermálny rastový faktor, <i>angl.</i> epidermal growth factor receptor |
| HGPRT | hypoxantin-guaninfosforibosyltransferaza, <i>angl.</i> hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase |
| HPLC | vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, <i>angl.</i> high-performance liquid chromatography |
| HYNIC | kyselina 2-hydrazinonikotínova, <i>angl.</i> 2-hydrazinonicotinic acid |
| IEF | izoelektrické zameriavanie, <i>angl.</i> isoelectric focusing |
| Ig | imunoglobulín, <i>angl.</i> Immunoglobuline |
| iTLC | instantná tenkovrstvá chromatografie, <i>angl.</i> instant thin-layer chromatography |
| LIF | fluorescencia indukovaná laserom, <i>angl.</i> laser-induced fluorescence |
| LSPR | rezonancia povrchových plazmónov, <i>angl.</i> localized surface plasmon resonance |
| mAb | monoklonálna protilátka, <i>angl.</i> monoclonal antibodies |
| MHC | histokompatibilný komplex, <i>angl.</i> major histocompatibility complex |
| NCAM | adhézná molekula neurálnych buniek, <i>angl.</i> neural cell adhesion molecule |

| | |
|-----------------|---|
| NP | nanočastice, <i>angl.</i> nanoparticles |
| PBS | fosfátový pufr, <i>angl.</i> Phosphate buffered saline |
| PET | pozitronová emisná tomografia, <i>angl.</i> positron emission tomography |
| PIGF | placentárny rastový faktor, <i>angl.</i> placental growth factor |
| RIA | radioimunologická analýza, <i>angl.</i> Radioimmunoanalysis |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovom gele v prítomnosti dodecylsíraniu sodného, <i>angl.</i> sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SKOV3 | ľudský ovariálny adenokarcinóm, <i>angl.</i> Human caucasian ovary adenocarcinoma |
| SPECT | jednofotonová emisná výpočtová tomografia, <i>angl.</i> single photon emission computed tomography |
| TNF | tumor nekrotizujúci faktor, <i>angl.</i> tumor necrosis factor |
| TRAIL | ligand indukujúci apoptózu súvisiaci s TNF, <i>angl.</i> TNF-related apoptosis-inducing ligand |
| VEGF | vaskulárny endoteliálny rastový faktor, <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor |
| VIS | viditeľné spektrum, <i>angl.</i> visible radiation |

2 Úvod a cieľ

Karcinóm ovária je malígny tumor, ktorý postihuje jedno alebo obidve ovária. Vyznačuje sa abnormálnou bunkovou proliferáciou a inváziou do okolitých orgánov. Pokiaľ je karcinóm ovária diagnostikovaný včas, je prognóza prežitia veľmi priaznivá. Karcinóm ovária celosvetovo predstavuje 6. najčastejší malígny nádor u žien. Medzi známe rizikové faktory sporadických karcinómov patria vek, hormonálna substitučná terapia, obezita.

Počiatky modernej doby liečby rakoviny chemoterapiou možno vysledovať do roku 1946. Od tej doby sa v liečbe onkologických ochorení používali stále nové a nové chemoterapeutiká, ktoré spolu s hormónovú liečbou, chirurgickou liečbou a rádioterapiou predstavovali jediné liečebné stratégie. Klasické cytostatiká účinkujú mechanizmom inhibície delenia buniek, poškodením bunkových štruktúr, priamym aj nepriamym poškodením DNA. Pokroky v biológii nádorov a poznaní mechanizmov onkogenézy umožnili identifikovať viaceré molekulárne ciele použiteľné v liečbe nádorových ochorení, ktoré sú využívané pri cielenej (biologickej) terapii.

Biologická liečba pôsobí priamo na špecifické molekuly v nádorovej bunke alebo na signálne dráhy, ktoré sú nevyhnutné pre rásť a proliferáciu nádorov, čím by sa dal očakávať vyšší účinok a nižšia toxicita. Tieto biologické ciele sa nachádzajú aj na zdravých bunkách, avšak ich expresia je v nádorových bunkách zvýraznená alebo sa vyskytujú v mutovanej forme. Zjednodušene môžeme povedať, že kým klasická chemoterapia účinkuje prevažne cestou indukcie apoptózy buniek, cieleňá liečba pôsobí cestou blokády proliferácie nádorových buniek. Predpokladom použitia biologickej liečby sú špecifické molekuly v nádorovej bunke či signálne dráhy dôležité v procese karcinogenézy.

V prípade radiodiagnostických aplikácií sa hľadá vhodná kombinácia biologicky účinnej látky ako napríklad monoklonálne protilátky alebo peptidu s radionuklidom emitujúcim γ -žiarenie, ktorá by špecificky lokalizovala miesta pre nádory so špecifickými štruktúrami tj. receptory, a tak uľahčila ich vyhľadávanie. V rámci terapie sa principiálne jedná o to isté len s tým rozdielom, že sa na biologicky aktívnu látku naviaže vhodný radionuklid z rad α - a hlavne β -žiariv, ktorý potom v mieste akumulácie radioaktívne značenej biologickej molekuly likviduje svojím časticovým žiarením DNA nádorovej bunky.

Cieľom predkládanej diplomovej práce bolo zistiť vhodnosť radioaktívneho značenia monoklonálnej protilátky ramucirumab radiodiagnostickým nuklidom ^{99m}Tc pomocou jeho väzby na protilátku cez chelatačné činidlo a následne otestovať čistotu takto pripraveného

radiopreparátu. Ďalším podstatným cieľom experimentálnej práce bolo testovanie zachovania afinity radioaktívne značenej protilátky k cieľovému receptoru pre vaskulárny endoteliálny faktor typu 2 experimentovaného na povrchu ľudskej nádorovej línií. *In vitro* testovanie afinity značenej protilátky k cieľovým receptorom bolo robené pomocou manuálnej techniky a techniky automatickej radioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase, kedy sa oboma metodami získané hodnoty medzi sebou porovnali.

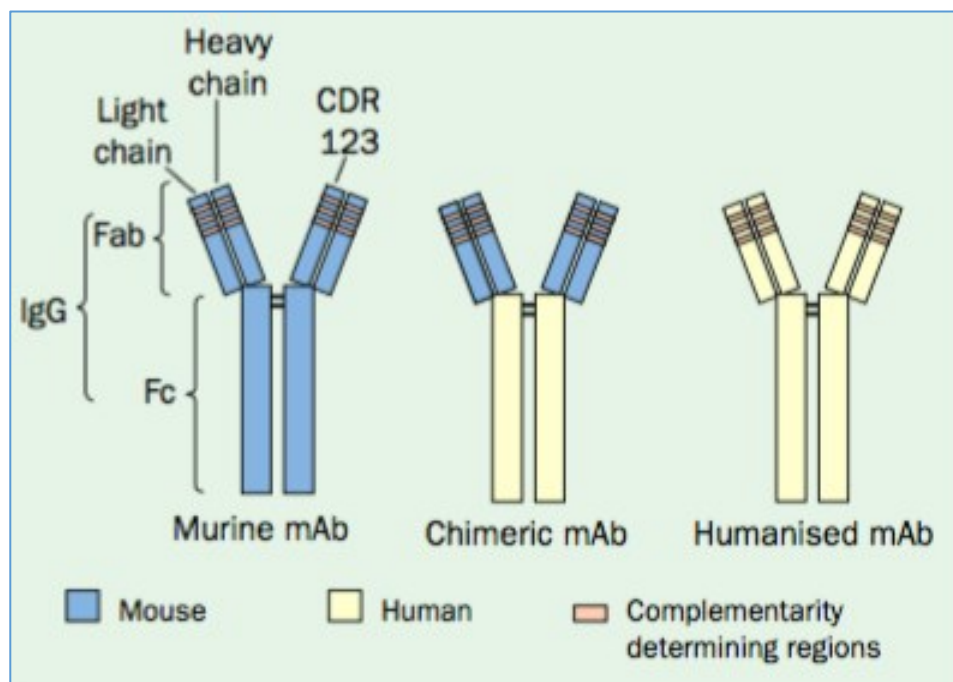
3 Teoretická časť

3.1 Imunitný systém a monoklonálne protilátky

3.1.1 História

Terapeutický rozvoj monoklonálnych protilátok (mAb) začal v polovici 70. rokov 20. storočia. V dnešnej dobe sa používa približne tridsať látok na terapiu ako imunitných tak aj nádorových či vírusových ochorení.

Okolo roku 2000 sa objavila technika rekombinantného inžinierstva, ktorá umožnila budovať protilátky prispôbené väzbovému miestu. Celý vývoj viedol k vzniku chimerickej, humanizovanej alebo plne ľudskej mAb ako je uvedené na **Obrázku 1**. [7]



Obrázok 1. Protilátka pozostáva z 2 ťažkých a 2 ľahkých reťazcov s rôznymi doménami. Fab fragment slúži ako miesto viažúce antigén, pozostáva z ťažkých a ľahkých variabilných reťazcov. Fc doména je nevyhnutná pre interakcie s efektorovými bunkami alebo na aktiváciu komplementovej kaskády. IgG- najvýznamnejšia trieda protilátok, vytvára štyri podtriedy. CDR 123- oblasť určujúca komplementaritu, súčasť variabilných reťazcov imunoglobulínov. Upravené podľa: [7]

Monoklonálne protilátky sú proteíny o veľkej molekulovej hmotnosti (cca 146 kDa), preto majú spomalenú kinetiku distribúcie a obmedzené vlastnosti penetrácie do tkaniva. Sú u človeka základom imunity nazývanej ako humorálna. Ich produkciu má na starosti jeden klon B-lymfocytov. Onkológia je obor, ktorý tieto látky výžíva najviac, no uplatňujú sa tiež pri infekčných či autoimunitných chorobách. Ide vlastne o glykoproteíny alebo inak nazývané tiež imunoglobulíny (Ig), majú vlastnosť afinity k nejakému konkrétnemu antigénu. Imunoglobulíny môžeme deliť do piatich skupín / tried A, D, E, G a M. Jedná celá molekula pozostáva z dvoch ľahkých a dvoch ťažkých reťazcou, a tie sú pospájané prostredníctvom disulfidických mostíkov. Ďalej pozostávajú z dvoch fragmentov jeden je variabilný a druhý je konštantný fragment. Časť, ktorú označujeme ako variabilnú (Fab) má na starosti ich špecifitu, sú to časti molekuly ktoré na seba viažu antigén. Táto Fab časť obsahuje tiež dve ťažké a dve ľahké domény. Druhý fragment tzv. konštantný fragment sa napája na variabilný a označujeme ho ako Fc fragment. Ten má na starosti zabíjať cieľové bunky prostredníctvom toho, že sa aktivuje komplement alebo skrz fagocytózu. Monoklonálne protilátky sú vždy tvorené lymfocytami na úkor nejakého podnetu a ten odpovedá cieľovému antigénu. [30] [7]

Schopnosť mAb preniknúť do nádoru je nižšia, čo je dané ako ich veľkou molekulovou hmotnosťou, tak horšou vaskularizáciou niektorých typov predovšetkým benígnych nádorov. Ako prvé sa používali myšacie protilátky, ale ich účinnosť bola spomalená z rôznych dôvodov. Príkladom je variabilná schopnosť myšacieho Fc fragmentu reagovať s ľudskými Fc receptormi a ďalej vznikom ľudských antimyšacích protilátok (HAMA), ktoré boli považované za hlavnú prekážku pre úspech liečby. Ide o protilátky, ktoré nepodporujú naviazanie myšacej monoklonálnej protilátky na cieľový antigen čo môže viesť až ku anafylaktickému šoku. Tieto problémy sa začali riešiť kombináciou myšacej mAb s ľudskou konštantou alebo produkciou úplne ľudskej mAb. Chimerizácia mAb zvyšuje perzistenciu mAb v ľudskom obehu vďaka nižšiemu riziku odmietnutia monoklonálnej protilátky hlavne reakciou imunitného systému. [7]

Účinnosť mAb závisí na charaktere cieľového antigénu a jeho funkcií, ďalej potom na hustote buniek na povrchu v cieľovom tkanive a v neposlednom rade na špecifite mAb.[7]

Nie u všetkých mAb je známy mechanizmus účinku. Najčastejšie sa hovorí o blokácii funkcie cieľového antigénu alebo o aktivácii komplementu. Ako jedna z prvých používaných protilátok bola chimerická mAb rituximab na liečbu hematologických malignít. [7]

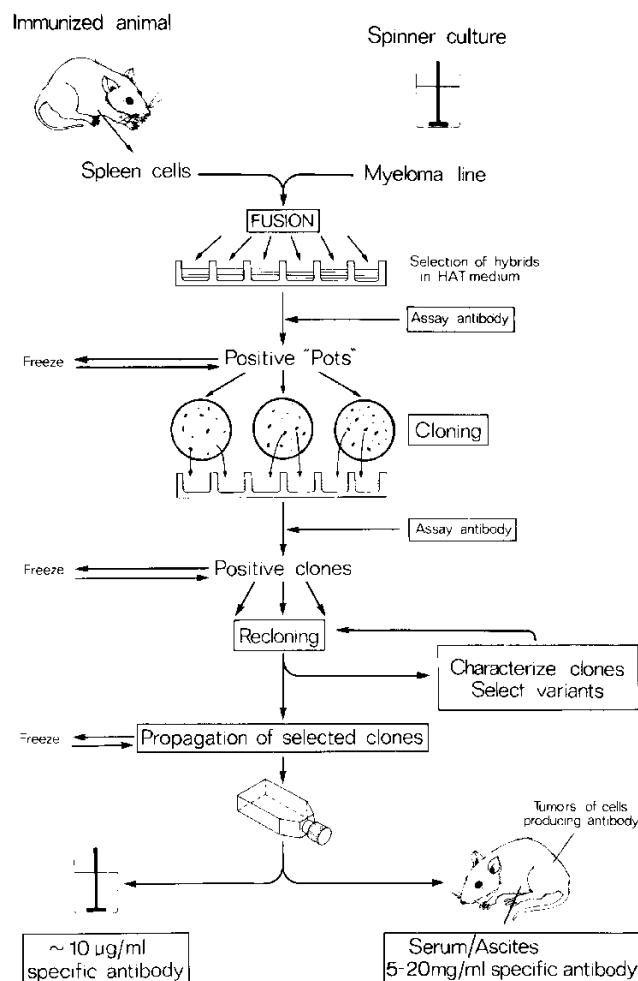
3.1.2 Príprava monoklonálnych protilátok

Metóda produkcie špecifických protilátok, ktoré su namierené proti danému imunogénu, je založená na základe fúzie (t.j. zlúčenia) buniek sleziny a myelomových myšacích buniek u imunizovaných zvierat. Bunky sleziny umierajú v celkom krátkej dobe, kdežto bunky myelomové sa adaptujú na *in vitro* prostredie a začínajú postupne rásť. Z nich sa izolujú tzv. mutanty (hybridy) s obsahom istých enzýmov. Avšak ich existencia je ovplyvnená prítomnosťou látok v médiu. Vznikom hybridov takýchto buniek a buniek sleziny sa môžu izolovať niektoré klony, ktoré vylučujú požadované protilátky, namierené na špecifické antigény. V tomto prípade hovoríme o protilátkach monoklonálneho pôvodu. [9]

V rámci prípravy monoklonálnych protilátok, sa aplikuje roztok obsahujúci rozpustný proteín-antigén do laboratornej myši alebo potkana. Aplikácia môže prebiehať podkožne na troch rôznych miestach (chrbát, nohy, chvost). Na desiaty deň sa odoberie kvapka krvi z chvosta, ktorá sa testuje na prítomné protilátky. Po mesačnej prestávke sa aplikujú potom intravenózne roztoky proteínu bez adjuvans. Po troch dňoch sa zviera usmrtí a izolujú sa z neho slezinové bunky. [9]

Zviera z ktorého sa potrebujú dostať slezinové bunky sa usmrtí prostredníctvom plynu, ponorí sa do 70% alkoholu a vyberie sa mu za sterilných podmienok slezina. Tá sa preplachne špeciálnym roztokom a nakrája sa na kúsky. Zásahom do sleziny vzniká suspenzia buniek sleziny v roztoku. Táto suspenzia sa nechá sedimentovať asi tri dni a potom sa preniesie do tuby s guľatým dnom. Odstredzuje sa 10 minút. Dochádza ku resuspendácii, kedy sa bunky scentrifugujú na dne a zostatková vodná časť nad nimi tzv. supernatant sa vyleje a znovu sa rozptýlia v novom médiu. [9]

Myelomové bunky sa získavajú rovnako ako bunky sleziny. Peletujú sa centrifugáciou rovnako ako bunky sleziny. Peleta sa resuspenduje a počíta. Ako každá nádorová bunka sa ľahko a rýchlo delí a má dlhú životnosť. Myelomové bunky sa získavajú v laboratorných podmienkach pomocou ich indukcie u pokusných zvierat po intraperitoneálnej aplikácii injekcie minerálneho oleja. Minerálny olej u experimentálnych zvierat pôsobí ako karcinogén a niektoré plazmocyty (zmutovabé B-lymfocyty) sa premenia v nádorové bunky myelomu, ktoré sa dajú potom ľahko odobrať a kultivovať. Zatiaľ ale neprodukujú požadované monoklonálne protilátky. Ide o myelómy bez enzýmu hypoxantinguanin fosforibosyltransferáza (HGPRT), ktorý katalyzuje metabolizmus purínov.[9]



Obrázok 2. Protokol fúzie myelomovej bunky s bunkami sleziny. B-lymfocyty sa väčšinou odoberajú zo sleziny alebo iného lymfatického orgánu použitého zvieraťa. Už mimo telo (in vitro) sa indukuje fúzia línie myelomových buniek bez HGPRT a extrahovaných B-lymfocytov pomocou propylenglykolu. Vznikajú hybridómy. Roztok propylenglykolu a ostatných reaktantov bude ale vedľa hybridómov s produkciou požadovaných monoklonálnych protilátok ešte obsahovať časť nesfúzovaných buniek (ako lymfocytov, tak myelomomových buniek) a hybridómy produkujúce iné než požadované imunoglobulíny. Bunková kultúra sa prenesie do média obsahujúceho hypoxanthin, aminopterin a thymidin (HAT-medium). Týmto zahynú aj nefúzované myelomové bunky, pretože neobsahujú enzým HGPRT a nie sú tak schopné využiť deriváty purínov obsiahnuté v živnom HAT-médii. Hybridomové bunky naopak vďaka podielu normálnych lymfocytov v genóme obsahujú sekvenciu pre enzým HGPRT a na HAT-medii prosperujú a proliferujú. Nakoniec pomocou špeciálnych testov z kultúry sa vydedia iba hybridómy produkujúce len jeden klon protilátok – monoklonálne protilátky. Upravené podľa: [9]

Izolované myelomové bunky sa následne fúzujú s požadovaným klonom B-lymfocytov ako to je znázornené na **Obrázku 2**. Z tejto fúzie vzniká hybridná bunka, ktorá sa nazýva hybridom. Ten si zachováva vlastnosti myelomových buniek aj B-lymfocytov, rýchlo sa delí, je takmer nesmrteľný a produkuje protilátky B-lymfocytu použitého pri fúzii. [9]

3.1.3 Technológie pre meranie fyzikálnych charakteristík protilátok

Proces výroby a formulácie terapeutických monoklonálnych protilátok ich vystavuje neintenzívnym matriciam, ktoré môžu viesť k zmene konformácie a tvorbe agregátov. Transformácia natívnej štruktúry môže ovplyvniť účinnosť lieku tým, že spôsobí nežiaduce klinické účinky u pacientov, napr. imunogénnu odpoveď. Môže sa vytvoriť niekoľko typov agregátov, ktoré zahŕňajú agregáciu pozostávajúcu z nekovalentných a kovalentných (často disulfidovo viazaných) dimérov a trimérov. Detekcia agregátov v počiatočnom štádiu je dôležitá, pretože by mohla ovplyvniť stratégiu čistenia. Najčastejšie používanou a veľmi účinnou metódou na meranie agregátov je HPLC. Táto metóda však nie je vhodná na rýchle sledovanie a kontrolu procesov. Príkladné metódy pre meranie fyzikálnych vlastností monoklonálnych protilátok sú zhrnuté v **Tabuľke 1**. V súčasnosti neexistuje žiadna ideálna analytická metóda na monitorovanie procesu agregácie alebo konformácie protilátok. Pre agregované meranie ide o kompromis medzi citlivosťou na detekciu nízkeho množstva (napríklad <1%) agregátov a rýchlosti analýzy. Napríklad SE HPLC (molekulová vylučovacia vysokoúčinná kvapalinová chromatografia) je pomerne citlivá, ale nie je rýchlym spôsobom merania agregátov. Väčšina metód určovania konformácie (alebo relatívnej konformácie) je pomerne necitlivá. [6]

Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou a ultrazvuk obidve sú relatívne rýchle techniky, ktoré vyžadujú minimálnu manipuláciu so vzorkami a ukázalo sa, že detekujú zmeny spôsobené agregáciou a konformačnými zmenami na proteínoch. Zmeny detegované FTIR môžu byť priradené k definitívnym štrukturálnym zmenám proteínu. V súčasnosti to nie je možné pre zmeny zistené ultrazvukom, kde je potrebná ďalšia práca na pochopenie toho, ktoré aspekty štruktúry bielkovín je možné sledovať. Výhodou ultrazvuku je však to, že se jedná o neinvazívne meranie. [6]

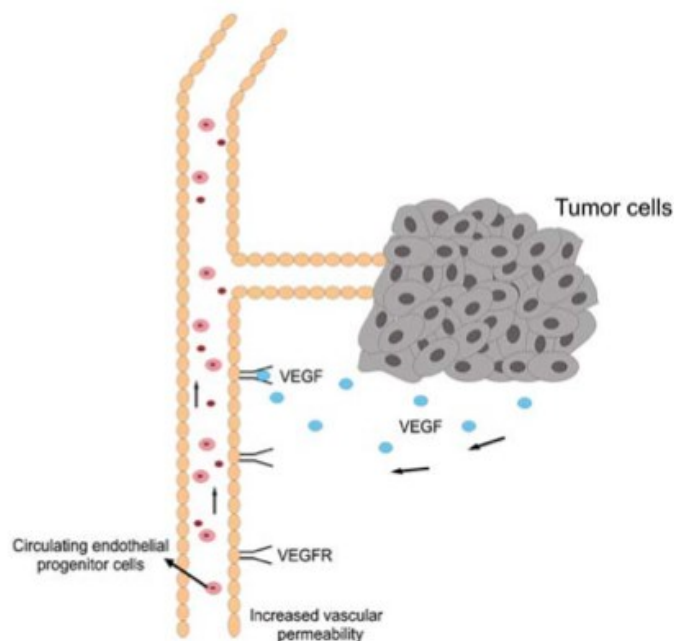
Tabuľka 1. Metódy pre meranie agregácie a konformácie. SE HPLC- molekulová vylučovacia vysokoúčinná kvapalinová chromatografia. Upravené podľa [6]

| Technique | Application | Advantages | Limitation |
|---|---|--|---|
| Fourier transformed infra-red (FTIR) | Conformation, secondary structure, tertiary structure | Rapid technique with minimal sample preparation requirements | Technique may not show minor changes in structure |
| Circular dichroism (CD) | Secondary structure | Minimal sample preparation requirements | The buffer matrix may interfere with analysis, requiring dilutions or buffer exchange |
| Micro-rheometry | Aggregation | Measures product viscosity and transition temperature. Minimal sample preparation requirements | The technique requires dedicated pressure supply and is not a rapid analytical tool |
| Differential scanning calorimetry (DSC) | Conformational aggregation | No sample preparation required. Multiple absolute parameters generated per single analysis | The technique is not a rapid system, recent development could increased throughput |
| Raman spectroscopy | Conformation, secondary structure tertiary structure | Minimal sample preparation required | High protein concentration required. Laser heat may induce changes in the sample. |
| Dynamic light scatter (DLS) | Aggregation | Rapid detection of aggregates | Sensitivity at very low aggregate levels |
| Static light scatter (SLS) | Aggregation | Absolute aggregate and monomer size measurement | This is not a rapid technique |
| SE HPLC | Aggregation | Aggregate and monomer size and contents measurements | Does not detect large aggregates Not rapid |
| Analytical ultracentrifugation (AUC) | Monomer and aggregate | Accurate aggregate size and contents determination | Protracted assay period |
| Ultrasound | Conformational aggregation | Non-invasive in-line for rapid analysis | Need to develop understanding of results |

3.2 Angiogenéza, VEGF rodina a jej receptory

Angiogenéza znázornená na **Obrázku 3** je veľmi dôležitá jednak pre fyzickú kondíciu ale jednak aj pre mnohé ochorenia ako je nádorové ochorenie alebo reumatoídna artritída a ďalšie. Ide o dej, kedy sa tvoria nové krvné cievy od už existujúcich. Celý tento proces zohráva dôležitú úlohu počas fetálneho vývoja. Nekontrolovaná angiogenéza môže predstavovať rôzne choroby. Dôležité je udržať rovnováhu medzi rastovými podpornými faktormi a rastovými inhibítormi. [14]

Vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF) je jeden z najdôležitejších a špecifických regulátorov angiogenézy. VEGF rodina obsahuje celkom sedem glykoproteínov. Menovite sa jedná o nasledujúce rastové faktory: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, placentárny rastový faktor (PlGF) a VEGF-F. Všetky tieto faktory interagujú so svojimi špecifickými transmembranovými receptormi s tyrozínkinázovou aktivitou. Po nadviazaní endoteliálnych faktorov na extracelulárnu doménu receptora dochádza k dimerizácii dvoch susedných receptorov, čož je chemická reakcia, pri ktorej dva receptorové monoméry reagujú za vytvorenia diméru. Následuje autofosforilácia, čož je proces zahrňujúci fosforyláciu určitej časti molekuly katalytickým účinkom inej časti tej istej molekuly v mieste intracelulárnych receptorov tyrozínkinázy.[8]



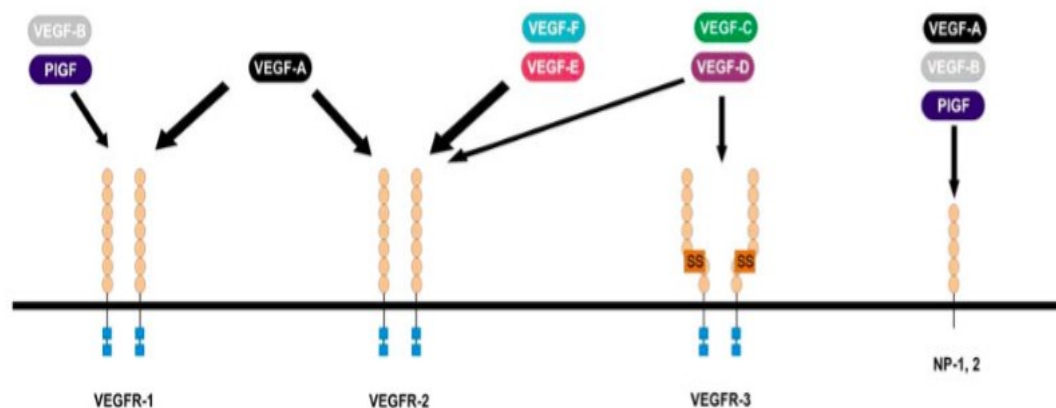
Obrázok 3. Grafické znázornenie angiogenézy. Sekrécia vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru (VEGF) je vyvolaná nádorom, hypoxiou, nízkymy pH a mnohými ďalšími faktormi. Väzba VEGF na jeho receptor (VEGFR) prebieha na endoteliálnych bunkách krvných ciev (ECs). Tie sa aktivujú a začnú produkovať enzýmy a molekuly, ktoré spôsobujú rásť a proliferáciu. Upravené podľa [8]

Medzi najviac preskúmané endoteliálne rastové faktory patrí VEGF-A, ktorý bol ako prvý ze skupiny VEGF identifikovaný. VEGF-A má svoj biologický účinok prostredníctvom interakcie s bunkovými povrchovými receptormi VEGFR-1 a VEGFR-2. Je to nádorom vylučovaný cytokin, ktorý má dôležitú úlohu ako pri normálnej, tak aj nádorovej angiogenéze. Má štyri izoformy (121, 165, 189, 206). Numerické označenie izoformami označuje počet aminokyselín v molekule. VEGF165 je prevládajúca izoforma a je nadmerne exprimovaná v rôznych solídnych nádoroch. Nedávno sa ukázalo, že VEGF165 môže byť významným biologickým indikátorom invazívnosti pooperačnej recidívy hepatocelulárneho karcinómu. [8]

Ľudský gén pre VEGF-B sa nachádza na 11 chromozóme a má dve polypeptidové izoformy 167 a 186. Promotor, t.j. sekvencia DNA, na ktorú sa viaže RNA polymeráza či iné súčasti transkripčného aparátu, má určité základné rozdiely od VEGF-A a tie zrejme spôsobujú zmeny v regulácii mnohých procesov. VEGF-B sa viaže na VEGFR-1. Väzbovosť jednotlivých faktorov na receptory je popísaná na **Obrázku 4**. Aktivácia tohto

receptoru vedie k mitogénéze (vývoj delenia buniek). *In vivo* úloha tohto faktoru nieje celkom známa. Ale bolo zistené, že myši, ktoré mali nedostatočné množstvo VEGF-B, mali menšie srdce a horšie zotavovanie po navodenom infarkte myokardu. [8]

VEGF-C, ktorý sa viaže sa na VEGFR-2 a VEGFR-3, je prekursorom, ktorý sa aktivuje vnútrobunkou proproteínovou konvertázou furínom. Proproteínové konvertázy sú rodina proteínov, ktoré aktivujú iné proteíny. Furín je serínová endoproteáza, ktorá štiepi proteínové prekurzory. Štiepenie zvyčajne vedie k aktivácii proproteínu, ale môže tiež inaktivovať alebo upraviť jeho aktivitu. Po uskutočnenej vzájomnej interakcii medzi VEGFR-3 a VEGF-C dôjde k ich spojeniu, ktoré zahŕňa disulfidické mostíky. VEGF-C indukuje mitogénézu a migráciu epiteliálnych buniek. Myši ktoré nemali alely VEGF-C, vykazovali zlyhanie vývoja lymfatických ciev a zomreli na edém. [8]



Obrázok 4. Vázby VEGF rodiny na ich receptory. VEGF- vaskulárny endotelový rastový faktor. PlGF-placentárny rastový faktor. NP-1,2- neuropilin, proteínový receptor. VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3- receptor pre vaskulárny endoteliálny rastový faktor. Upravené podľa [8]

VEGF- D sa viaže na VEGFR-2 a VEGFR-3. Je úzko príbuzný s VEGF-C v dôsledku jedinečnej prítomnosti N a C-koncových predĺžení, ktoré ostatným členom VEGF rodiny chýba. Je produkovaný mnohými nádormi a má dôležitú úlohu v nádorovej angiogénéze a lymfangiogénéze pri nádore žalúdka, pľúc alebo prsníka. [8]

VEGF-E je najmenej preštudovaný faktor. Má iba 10-25% aminokyselín zhodných s VEGF-A. Tento ligand sa špecificky viaže s vysokou afinitou na VEGFR-2. [8]

PlGF (placentárny rastový faktor) bol pôvodne objavený v placente, kde je hojne exprimovaný, ďalej bol nájdený tiež v srdci a pľúcach. Doteraz boli popísané štyri ľudské

izoformy PlGF označované ako PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 a PlGF-4, ktoré sa líšia veľkosťou a väzbovou afinitou. Strata funkcie PlGF zhoršuje angiogézu, hojenie rán, zápal a prognózu nádoru. Nadmerná expresia PlGF v koži transgénnych myší má za následok výrazné zvýšenie počtu a veľkosti kožných krvných ciev, rovnako ako zvýšenie vaskulárnej permeability. [8]

Nedávno objavený siedmy člen VEGF rodiny VEGF-F bol identifikovaný z hada. Hadí jed je atraktívny zdroj molekúl, ktoré majú jedinečné biologické aktivity. Bolo nedávno odhalené, že niektoré hadie jedy obsahujú VEGF-homológne proteíny, ktoré vykazujú jedinečné biologické vlastnosti. Izolácia VEGF-F z jedu hada *Daboia siamensis* prebiehala s použitím špeciálneho antiséra ako detekčného činidla s využitím chromatografie. Tento proteín označený ako VR-1 bol purifikovaný zo surového jedu pomocou štyroch chromatografických krokov: gélova filtrácia, afinita heparínu, anionová a kationtová výmena. Po tomto purifikačnom postupe bol získaný purifikovaný proteín. SDS-PAGE ukázala, že očistený VR-1 mal molekulovú hmotnosť typickú pre VEGF-F; tj. 27,1 kDa za neredukčných podmienok a 15,4 kDa za redukčných podmienok. VR-1 sa selektívne viaže na VEGFR-2. [11]

Doposiaľ sú identifikované tri typy VEGF receptorov, ktoré označujeme ako VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3. VEGFR-1 (FMS-like tyrosine kinase; Flt-1) sa skladá zo siedmich homológnych domén extracelulárnych imunoglobulínov (Ig), jednej transmembránovej oblasti a intracelulárnej domény tyrozínkinázy. VEGFR-1 viaže VEGF-A, VEGF-B a PlGF s vysokou afinitou. Počas vývoja je VEGFR-1 najprv exprimovaný v angioblaste a v endoteli. Rozpusťný VEGFR-1 je exprimovaný v niekoľkých nádoroch, vrátane nádoru prsníka. [15]

Proteín VEGFR-2 sa produkuje ako proteín, ktorý sa spracováva na konečnú formu bielkoviny s hmotnosťou približne 200 kDa. Táto molekula je ďalej glykozylovaná na formu 230 kDa a exprimovaná na povrchu buniek. VEGFR-2 podlieha dimerizácii a silnej fosforylácii tyrozínu v intaktných bunkách (aktivuje sa) a vedie k mitogennému, chemotaktickému a prosurvivalnému signálu. VEGFR-2 viaže VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E. Vedľa povrchu endoteliálnych buniek (EC) je VEGFR-2 tiež exprimovaný na neurónových bunkách, osteoblastoch, megakaryocytoch. [15]

VEGFR-3 má iba šesť Ig-homologických domén. VEGFR-3 prednostne viaže VEGF-C a VEGF-D. Tento receptor je široko distribuovaný vo vaskulárnych nádoroch a môže byť považovaný za marker diferenciácie endotelových buniek vaskulárnych

novotvarov. Ukázalo sa, že zvýšená expresia VEGF-C a VEGFR-3 hrá úlohu v progresii karcinómu prostaty a metastázy lymfatických uzlín. Blokáda VEGFR-3 významne inhibovala lymfangiogézu a metastázy lymfatických uzlín. Teda blokovanie VEGFR-3 špecifickými inhibítormi môže inhibovať nový lymfatický rásť. [14]

VEGF ovplyvňuje receptory na krvných bunkách endotelu ale aj lymfatických cievach. Stimulácia týchto ciev cez VEGF vedie k bunkovému rastu, inhibícií bunkovej smrti a k tvorbe nových krvných ciest. Uplatňuje sa teda pri angiogenéze. Jeho produkcia je zvýšená pri malignom novotvare. Angiogénny faktor sprostredkúva rast nových buniek z už existujúcich ciev (t.j. angiogenéza) väzbou na receptor VEGFR-1 a VEGFR-2 na endotelových bunkách. [15]

Schopnými cieľmi pre protilátkovú liečbu sú vnutrobunkové onkoproteíny. To znamená, že cieľom technológií je budovať látky, ktoré by s týmito proteínami interferovali. Najideálnejším pokrokom by bolo nájsť protilátku, ktorá by bola cielená na celé nádorové tkanivo s minimálnym poškodením zdravých buniek. [8]

3.3 Väzbové testy

3.3.1 Testy s monoklonálnou protilátkou na mikrotitračnej doštičke

Pripravené protilátky v kultivačnej tekutine pomocou vyššie uvedenej metódy (3.1.2.) sa nechajú zreagovať s antigénom ukotveným na povrchu mikrotitračnej doštičky, pričom nenaviazaná protilátka sa zmyje pri následnom oplachovaní. Množstvo monoklonálnej protilátky naviazané sa zmeria buď testom priamej väzby alebo nepriamym testom, kedy sa meria väzba nejakej druhej označenej protilátky, ktorá je schopná rozpoznať prvú protilátku. Patrí sem napríklad tzv. nerozpustnosť antigénu. Niektoré antigény sú prirodzene nerozpustné (napríklad antigény z bunkového povrchu). Iné, ktoré sú rozpustné, sa dajú prerobiť na nerozpustné tým, že sa pripoja na plast alebo polystyrenové guľičky. [9]

A. Insolubilizácia antigénu

Maličké antigény tzv. haptény sa môžu spájať s proteínami. Do každej jamky mikrotitračnej doštičky sa pridá proteínový antigén a nechá sa inkubovať cez noc. Zbytok, čo ostal, sa odsaje a pridá sa PBS s obsahom BSA a opäť sa inkubuje pri izbovej teplote 3-4 hodiny. V tomto štádiu sa môže uchovávať 1 týždeň pri 4°C. Nakoniec sa roztok PBS s BSA odstráni. [9]

B. Príprava látky označenej jódom

Pomocou striekačky v čase potreby sa preniesie do sklenenej tuby roztok značený jódom, k nemu sa pridá chloramin T a roztok proteínu. Zmes sa premieša a inkubuje 2 minúty. Pridá sa tyrozín, 1% BSA-PBS a čisté PBS. Zmes sa premieša. Pomocou pasterovej pipety sa táto zmes opatrne naniesie na kolonu. Nanieslo sa tri krát 0,2 ml zmesi a 0,5 ml PBS. Roztok značeného proteínu sa vloží do gamma counter prístroja. Takto pripravený roztok sa uchováva pri teplote 20 °C po dobu 1-2 mesiacov.[9]

C. Test nepriameho viazania

Každá jamka pripravenej mikrotitračnej doštičky sa naplní bunkovou suspenziou. (bunky suspendované v 10% PBS BSA). K nim sa pridá kultivačné medium, ktoré sa má testovať. Obsah jamiek sa zmieša na rotačnej miešačke. Platnička sa zakryje a inkubuje sa pri 4°C hodinu. Doštičky sa premyjú 10% PBS BSA, ktorý sa následne odstráni. Pridá sa radioaktívna protilátka pripravená v bode B. Po premiešaní sa doštička opäť inkubuje a premyje za rovnakých podmienok ako je uvedené vyššie. Doštičky sa vysušia a umiestnia do košíčkou gamma counter prístroja. [9]

3.3.2 Test hemaglutinácie

Ďalší spôsob testovania pripravených mAb sa zakladá na schopnosti protilátky aglutinovať červené krvinky, ktoré nesú nejaký špecifický antigén. Výhodami je jednoduchosť a rýchlosť, ale nevýhodami je inhibičný účinok spôsobený nadbytkom protilátky a nepresnosť. Existuje však mnoho ďalších testov v tomto obore ako napríklad lytické testy, kedy tieto testy sú založené na lýze buniek protilátkou alebo komplementom; a ďalej testy založené na biologickej aktivite antigénu, kedy protilátky je možné rozpoznať svojím účinkom na biologickú aktivitu antigénnej látky. [9]

3.4 Analytické procesy čistenia protilátok

Pre efektívne určenie čistoty, identity, integrity a aktivity týchto dôležitých tried liečiv je potrebné použiť radu analytických metód. Patria sem najmä elektroforéza, HPLC a imunotesty. Metódy testovania produktu sú zamerané na určité vlastnosti výrobku a spadajú do dvoch všeobecných kategórií. Tie boli zamerané na definovanie fyzikálnych a chemických vlastností molekuly protilátky a po druhé definujúce profil nečistôt. [6]

3.4.1 Elektroforetické technológie pre identitu, čistotu a integritu protilátok:

Identita a celistvosť monoklonálnych protilátok musia byť testované vo všetkých fázach procesu od bunkovej kultúry až po následné čistenie, charakterizáciu produktu a uvoľňovanie šarže. V každom kroku musí byť potvrdené, že sa vyrába správny výrobok, že má zodpovedajúcu čistotu a je neporušený a že nedošlo k žiadnym nežiaducim zmenám protilátky. Elektroforetické metódy sú ideálne vhodné pre testovanie čistoty, identity a integrity produktov protilátok. Najčastejšie používané metódy elektroforézy sú izoelektrické zameriavanie (IEF) a dodecylsulfát sodný-polyakrylamidovom gélová elektroforéza (SDS-PAGE). IEF separuje proteíny na základe ich čistého náboja, zatiaľ čo SDS-PAGE sa oddeľuje na základe veľkosti (molekulovej hmotnosti) proteínov. IEF sa používa pre identitu a SDS-PAGE hlavne pre testy integrity a čistoty.[6]

Separácia náboja kapilárnou elektroforézou ide o test, ktorý je stále pomerne náročný na prácu a testy môžu trvať dlhšie ako jeden deň. Metóda nieje vhodná pre rýchlu analýzu. Zásadne rovnaké techniky vykonávané tradičnou elektroforézou na doštičkách môžu byť tiež vykonávané kapilárnou elektroforézou (CE), ale s potenciálne zvýšenou citlivosťou a rozlíšením. Kľúčovou charakteristikou metód CE je to, že poskytujú ďalšiu výhodu rýchleho merania pri meraní on-line pomocou automatických vzorkovačov pre prevádzku bez obsluhy. Nástroje CE sú ideálne vybavené pre automatizáciu a sú veľmi podobné vysokovýkonnej kvapalinovej chromatografii vo funkciách. To poskytuje významné automatické výhody oproti tradičnej gélovej elektroforéze na doskách. Menšie rozdiely hustoty náboja medzi izoformami môžu byť rozdelené IEF a používa sa ako metóda odtlačkov prstov na identifikáciu, že sa vytvára správna forma protilátky. Testované vzorky sa analyzujú vedľa referenčnej vzorky a profil náboja medzi oboma vzorkami sa porovnáva. Oddelenie CE je zvyčajne oveľa rýchlejšie ako elektroforéza na doštičkách. Avšak po dosiahnutí separácie je potrebné mobilizovať zložky kapiláry (tlačené cez kapiláru) tak, aby bol dosiahnutý prietok cez bodový detektor. Detekcia analytov sa dosahuje bodovou detekciou pomocou UV absorpcie alebo fluorescencie indukovanej laserom blízko koncového bodu kapiláry. [6]

Rozdelenie veľkosti elektroforézou. Okrem potvrdenia totožnosti produktu za použitia IEF je integrita a čistota produktu často monitorovaná elektroforézou. Pre integritu produktu sa produkt protilátky analyzuje použitím redukčnej i neredukčnej SDS-PAGE. V neredukujúcom SDS-PAGE sa vzorky analyzujú na veľkosť a čistotu. Podobne pri redukovanom SDS-PAGE sa jednotlivé proteínové podjednotky analyzujú na veľkosť a

čistotu ale najprv spracovaním proteínového produktu redukčným činidlom, aby sa znížila akákoľvek intramolekulárna a intermolekulárna disulfidová väzba v proteíne. Rozpustenie intaktnej protilátky je ľahko detekované pomocou neredukujúceho SDS-PAGE. Redukcia SDS-PAGE je veľmi účinná pri stanovení fragmentácia (proteolýzy) podjednotiek ťažkého a ľahkého reťazca protilátky.[6]

Najčastejšie sa používa HPLC na určenie veľkosti. Veľkostne vylučovacia chromatografia sa používa ako nedeštruktívna metóda pre sledovanie agregátov natívnych monoklonálnych protilátok, ktoré sú výsledkom kovalentných alebo nekovalentných interakcií. Disociačné a fragmentačné produkty môžu byť tiež merané, aj keď úroveň rozlíšenia dosiahnutá medzi týmito druhmi je oveľa nižšia ako u SDS-PAGE. Elúcia proteínov z kolón je normálne monitorovaná bežnými spektrofotometrickými detektormi nastavenými na zvolenú vlnovú dĺžku (napríklad 215 a 280 nm). Hlavným problémom, s ktorým sa pri tejto metóde stretávame, je interakcia molekúl protilátky s matricou stĺpca, čo vedie k nonideálnej chromatografii, ktorá je pozorovaná ako pikové rozšírenie a elúcia pri zdanlivo nižších molekulových veľkostiach. Hydrofóbné interakcie môžu byť minimalizované zahrnutím malého množstva detergentov alebo organického rozpúšťadla do mobilnej fázy, zatiaľ čo iónové interakcie sú hlavne riadené zmenou pH alebo iónovej sily. Pridanie nábojov chaotropického činidla môže pomôcť minimalizovať oba typy síl. V tomto smere boli najvhodnejšie aminokyseliny (napríklad lyzín a arginín). Oddelenie zvyčajne trvá 30 minút, a preto technika nie je vhodná pre rýchlu analýzu. Reverzná fáza HPLC môže byť použitá ako test všeobecnej čistoty pre protilátky. Zistené nečistoty budú obsahovať proteíny (tj. fragmenty alebo agregáty súvisiace s produktom) a tiež neproteiny odvodené z výrobného procesu. [6]

3.5 Imunitný systém v boji proti nádorom

Vývoj nových cytotoxických látok, radiačnej terapie a chirurgických postupov zlepšil prežitie a kvalitu života pacientov. Obmedzenie účinnosti a tolerancie liečby donutili výzkumníkov k vypracovaniu nových stratégií, ktoré pomôžu znížiť toxicitu pri liečbe a zlepšiť mieru prežitia u pacientov s nádormi. Vedci boli povzbudzovaní, aby prezkúmali spôsoby využívania sily imunitného systému k boju proti nádorovým ochoreniam. Cieľom bolo vyvinutie špecifických protilátok namierených proti jedinečnému cieľu, ktorý by inhiboval nádorové bunky pri zachovaní normálneho tkaniva. [25]

3.5.1 Antigény tumoru a imunogenicitá

Generovanie imunitnej odpovede zahŕňa niekoľko faktorov. Antigény sú široko definované ako zložky buniek alebo iných látok, ktoré môžu imunitný systém rozpoznať. Antigény interagujú s B-lymfocyty, dendritickými bunkami, makrofágmi a ďalšími bunkami (bunky prezentujúce antigén), tieto molekuly sú v spojení s hlavným histokompatibilným komplexom (MHC) II pre rozpoznanie imunitným systémom. T-bunky taktiež hrajú dôležitú úlohu v rozpoznávaní antigénov. Aktivované bunky CD4⁺ stimulujú cytotoxické T-bunky, aktivujú monocyty a zlepšujú funkciu B-lymfocytov. Akonáhle je antigén rozpoznaný, vzniká kaskáda aktivity s produkciou cytokinov, proliferáciou klonov B-lymfocytov a nakoniec produkciou protilátok. [25]

Nie všetky antigény sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď. Nádorové bunky všeobecne majú zníženú schopnosť vyvolať imunitnú odpoveď. Tumorové bunky taktiež často nemajú antigény, ktoré sa líšia od antigénov normálnych tkanív a uniknú mechanizmom imunitného dohľadu. Navyše pre nádorové antigény, ktoré sa líšia od normálnych tkáňových antigénov, môžu existovať prekážky pre prezentáciu nádorového antigénu na efektorové bunky, čo pravdepodobne znižuje obvyklú imunitnú odpoveď. [25]

3.5.2 Fungovanie proteínovej terapie

Existuje mnoho možných spôsobov ako protilátková terapia funguje v boji proti nádorovému procesu a je pravdepodobné, že pri podávaní špecifickej protilátky existuje niekoľko mechanizmov účinku. Protilátky môžu interagovať s antigénami na bunkách a majú priame cytotoxické účinky. Jeden navrhnutý mechanizmus priameho protilátkami sprostredkovaného bunkového usmrtenia je prostredníctvom indukcie programovanej bunkovej smrti (apoptózy). [25]

Ďalší mechanizmus zahŕňa bunkovú závislosť na celulárnych receptoroch pre proliferáciu a interakciu s inými bunkami. Protilátky totiž môžu priamo blokovать tie receptory, ktoré sú životne dôležité pre funkciu buniek a rásť, čo nakoniec vedie k smrti buniek. Alternatívne môžu pri použití samotnej protilátky mať nepriame účinky, ktoré vedú k smrti nádorových buniek. Jedným z dôležitých mechanizmov je indukcia bunkovej cytotoxicity závislá na protilátke. Keď sa protilátka viaže na bunku, Fc časť imunoglobulínu môže byť viazaná efektorovou bunkou ako lymfocyt, monocyt, makrofág atď. To vedie k deštrukcií cieľovej bunky. Schopnosť protilátky produkovať cytotoxicitu závislu na protilátkach závisí na množstve faktorov, vrátane množstva antigénu prítomného na

nádorových bunkách, typu efektorovej bunky aktivovanej protilátkou a podtriedy protilátky. Interakcie protilátky a antigénu môžu taktiež spôsobiť bunkovú smrť prostredníctvom komplementu zprostredkovanej cytotoxicity. V tomto prípade Fc časť protilátky interaguje s komplementom, čím sa aktivuje komplementárna kaskáda a vedie nakoniec ku komplementu zprostredkovanej lýze bunky. [25]

Aby sa zvýšila odozva protilátkovej terapie, vedci vyvinuli protilátky pre transport toxických látok do nádorových buniek za účelom zvýšenia účinnosti protilátok. Jedným z takýchto prístupov je kombinovať radionuklidy s protilátkami k podávaniu koncentrovaných dávok žiarenia na nádory. Okrem vplyvu na primárne cieľové bunky pôsobí ožiarovanie na okolné bunky, ktoré nemusia mať dostatočnú expresiu cieľového antigénu, ako vedľajší účinok. Radionuklidy sú často vyberané podľa ich štruktúry cieľových buniek a distribúcie emitovaného žiarenia. Radiotoxická sa môže prejavovať, pokiaľ je radionuklid viazaný na protilátku v obehu príliš dlho alebo má distribučný objem, ktorý umožňuje poškodenie hematopoetických buniek v kostnej dreni. Protilátky môžu byť podobne spojené s individuálnymi chemoterapeutickými molekulami, ktoré pomáhajú prenášať toxické látky lokálne pôsobiace na nádory. Alternatívne môže dodávka enzýmov do nádoru umožniť konverziu proliečiv na aktívne chemoterapeutické činidlá v jednotlivých nádorových bunkách, opäť za účelom zníženia systémovej expozície a vedľajších účinkov. [25]

Ako bolo uvedené vyššie, technológia hybridómu bola vyvinutá v 70. rokoch 20. storočia. Táto technológia umožnila masovú produkciu myšacích protilátok namierených proti ľudským antigénom. Myšacie protilátky majú mnoho nevýhod, ktoré im brania mať optimálnu účinnosť. Keďže niesú ľudské, samotné protilátky sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď zo strany organizmu. Ľudské protilátky môžu byť vytvorené proti myšacím terapeutickým protilátkam, kedy tieto ľudské protilátky nesú označenie HAMA (ľudské protilátky proti myšacím), čož znižuje možnosť terapie byť opakovane podávaná po dobu liečby pacienta. Vývoj HAMA nastáva obvykle po opakovanej expozícií podanej myšacej protilátky. Akonáhle nastane imunitná reakcia, môžu byť podané protilátky rýchlo vylúčené z obehu. Aby sme pomohli znížiť imunogenicitu myšacích protilátok, boli vyvinuté chimérické a humanizované protilátky. [25]

3.5.3 Možné príčiny nefungujúcej protinádorovej liečby pomocou protilátok

Existuje mnoho dôvodov, prečo liečba pevných nádorov s použitím protilátok nemala významný úspech. Jeden problém s liečbou monoklonálnou protilátkou pre zistené pevné

tumory je heterogenné rozloženie protilátok v nádoroch. Existuje taktiež nehomogénny prietok krvi do nádoru a v samotných nádoroch vysoký intersticiálny tlak, ktorý znižuje schopnosť protilátok infiltrovať nádory. Existujú tiež dôkazy, že uvoľnený (nenaviazaný) antigén môže viazať podávanú protilátku, čo znižuje celkovú dostupnú dávku pre nádorové bunky. Navyše niektoré z predchádzajúcich klinických štúdií používajúcich monoklonálne protilátky odhalili neočakávané vedľajšie účinky spôsobené skríženou reaktivitou cieľového nádorového antigénu s antigénom exprimovaným na normálnych tkanivách. Aby sme pomohli znížiť možnú zkríženú reaktivitu protilátok s normálnym tkanňovým antigénom, vedci sa sústredili na hľadanie špecifických nádorových cieľov. [25]

3.5.4 Špeciálne antigény

Onkofetálne antigény sú typom antigénov, ktoré sú exprimované na niektorých plodových tkanivách behom fetálneho vývoja. Ich prítomnosť u jedincov po narodení je spjata s niektorými typmi nádorov, ale tiež aj niektorých fyziologických tkanivách. Antigény špecifické pre nádory, sú antigény, ktoré sa často nachádzajú na nádoroch alebo sa vyskytujú vo väčšej miere než odpovedajúce normálne tkanivo. [25]

Črevo. Jedným z antigénnych cieľov, ktoré sú v súčasnosti skúmané, je antigén CD17-1A. Tento antigén je nadmerne exprimovaný mnohými epiteliálnymi nádormi a má sa za to, že hrá úlohu v adhezií epiteliálnych buniek. Predklinická práca ukázala, že myšacia monoklonálna protilátka proti tomuto antigénu, 17-1A [edrecolomab (Panorex TM)], bola schopná indukovať cytotoxicitu sprostredkovanú bunkovou protilátkou. Okrem toho existuje dôkaz, že 17-1A priamo inhiboval rás nádorov *in vivo*. Počiatočná fáza I a II štúdie tieto protilátky v metastazujúcom karcinóme hrubého čreva ukázali minimálne toxické účinky terapie, spočívajúce predovšetkým v miernych alergických reakciách a vývoji HAMA. [25]

Pľúca. Štúdie skúmajú antigény, ktoré znižujú prognózu nemalobunkového a malobunkového karcinómu pľúc, čo pomáha identifikovať ďalšie ciele pre vývoj protilátok. Niektoré sa zamerali na adhezné molekuly neurálnych buniek (NCAM), ktoré boli podrobne skúmané u kurčiat a myší, a ktoré pozostáva z troch hlavných izoformiem podľa ich molekulových hmotností (180,140 a 120 kDa). Táto rodina markerov indikuje neuroendokrinné diferenciácie nádoru pľúc. Tieto markery sa podieľajú na intercelulárnych interakciách a dajú sa nájsť tiež v rôznych normálnych tkanivách. [25]

3.6 Terapia nádorového ochorenia monoklonálnymi protilátkami

Monoklonálne protilátky môžu byť taktiež použité pre priame zameranie, aby priamo zabíjali nádorové bunky alebo aktivovali proliečiva špecificky vo vnútri nádoru (protilátkou-riadená enzýmová terapia). Indikácie niektorých mAb sú uvedené v **Tabuľke 2**. Konečne, monoklonálne protilátky môžu byť používané s tradičnými chemoterapeutickými činidlami, ktoré napádajú nádory prostredníctvom komplementárnych mechanizmov účinku. [16]

Tabuľka 2. Monoklonálne protilátky používané v terapii nádorov. HER2/neu- humánny epidermálny receptor, CD20- B-lymfocytový antigén, fosfoproteín prítomný na povrchu všetkých B-buniek. EGFR- receptor epidermálneho rastového faktora. VEGF- vaskulárny endotelový rastový faktor, CD52- glykoproteín prítomný na povrchu zreých lymfocytov. CD33- transmembranový receptor exprimovaný na bunkách myeloidnej línie. Upravené podľa [16]

| Generic name (trade name) | Origin | Isotype and format | Target | Indication |
|--|----------------------------|---|--------------|------------------------------|
| Trastuzumab (Herceptin) | Humanized | Human IgG 1 | HER2/neu | Breast cancer |
| Rituximab (Rituxan) | Murine-human chimeric | Human IgG 1 | CD20 | Lymphoma |
| Cetuximab (Erbix) | Murine-human chimeric | Human IgG 1 | EGF receptor | Colorectal cancer |
| Bevacizumab (Avastin) | Murine-human chimeric | Human IgG 1 | VEGF | Colorectal, lunge cancer |
| Alemtuzumab (Campth-1 H) | Humanized | Human IgG 1 | CD52 | Chronic lymphocytic leukemia |
| Imunoconjugates | | | | |
| Ibritumomab tiuxetan together with Rituximab | Murine | ⁹⁰ Y-radiolabeled murine IgG 1 | CD20 | Lymphoma |
| Tositumomab | Murine | ¹³¹ I-radiolabeled murine IgG 2a | CD20 | Lymphoma |
| Gemtuzumab (Mylotarg) | Human (from streptomycete) | Human IgG4 conjugated to calicheamicin | CD33 | Acute myelogenous leukemia |

3.6.1 Bunková cytotoxicita závisla na protilátkach

Bunková cytotoxicita závisla na protilátkach sa vyskytuje, keď sa protilátky viažu na antigény na nádorových bunkách a Fc domény protilátky zaberajú Fc receptory (FCR) na povrchu imunitných efektorových buniek. Hoci bolo preukázané, že veľa protinádorových mAbs sprostredkováva ADCC *in vitro*, no relevantnosť tohto mechanizmu účinku na klinickú účinnosť nebola u testovaných pacientov preukázaná. Komplementárna kaskáda končí tvorbou komplexu membránového útoku, ktorý vytvára v bunkovej membráne póry, ktoré uľahčujú voľný priechod vody a rozpustených látok do a z bunky. [17] [16]

3.6.2 Cytotoxicita závislá na komplemente

Cytotoxicita závislá na komplemente (CDC) je ďalšia možnosť odstránenia buniek, ktorá môže byť riadená protilátkami. Schopnosť protinádorovej mAb vyvolať CDC môže závisieť na lokálnej hustote antigénu vo vybranej časti bunkového povrchu. Táto situácia by poskytla vysokú hustotu protilátok, ktorá je nevyhnutná pre aktivovanie C1q (komplementová komponenta, je súčasťou imunitného systému), súčasným viazaním aspoň dvoch molekúl IgG na povrchu nádorovej bunky. Uvoľňovanie chemotaktických aktivačných činidiel C3a (jeden z produktov rozštiepenia komplementovej zložky C3) a C5a (proteínový fragment uvoľnený zo štiepenia komplementovej zložky C5) vedie ku gradientu, ktorý priťahuje efektorové bunky, ako sú NK bunky (prirodzené zabijácké bunky) do nádoru. Molekuly aktivačného produktu C3b komplementu C3 uloženého na povrchu nádorových buniek aktivujú komplementový receptor 3 (CR3) na povrchu efektorových buniek a indukujú CR3-dependentnú bunkovú cytotoxicitu. Dochádza ku zmenám prenosu signálu. [16]

3.6.3 Ďalšie solídne nádorové antigény

Ligand indukujúci apoptózu (TRAIL), ktorý je spojený s faktorom nekrotizujúcim nádor (TNF), je členom superrodiny ligandu TNF. Indukuje apoptózu v mnohých nádorových bunkových líniiach s minimálnym alebo žiadnym účinkom na väčšinu normálnych buniek. TRAIL sprostredkováva apoptózu v rôznych typoch nádorových buniek *in vitro* a *in vivo* prostredníctvom dvoch receptorov smrti, TRAIL-receptora 1 (TRAIL-R1) a TRAIL-receptora 2 (TRAIL-R2). Apoptóza indukovaná receptorom smrti TRAIL zahŕňa aktiváciu ako vonkajších, tak vnútorných intracelulárnych signálov smrti. [16]

3.6.4 Molekulárna diagnostika, prediktívne biomarkery a rezistencia voči liekom

Inhibítory proteínkinázy teraz zohrávajú vedúcu úlohu v liečbe onkologických ochorení, čo je príklad využitia onkogénov malých molekúl. [2] Celkom 24 inhibítorov kinázy malých molekúl bolo schválených na použitie ako terapeutické činidlá sú zhrnuté v **Tabuľke 3**, z ktorých 17 je určených priamo na liečbu nádorových ochorení. [4] Navyše štyri monoklonálne protilátky (imatinib, dasatinib, sorafenib, nilotinib) pôsobiace na ciele proteínkinázy boli tiež povolené na liečbu nádorových transformácií. [3]

Dôležitým aspektom molekulárnej diagnostiky je analýza prognostických markerov u niektorých malignít. Zvýšená citlivosť metód môže viesť k detekcii "subklinických" mutácií, to znamená tých, ktoré sú prítomné v malom nádore, čo môže viesť k negatívnemu vplyvu na odpoveď na niektoré terapie. Preto je otázne, či jednotlivá biopsia primárneho nádoru môže poskytnúť požadovanú informáciu na liečbu metastatických ochorení. Na druhej strane existujú dôkazy o tom, že kľúčové počiatočné mutácie sú všeobecne prítomné v primárnych a metastatických biopsických vzorkách. [2]

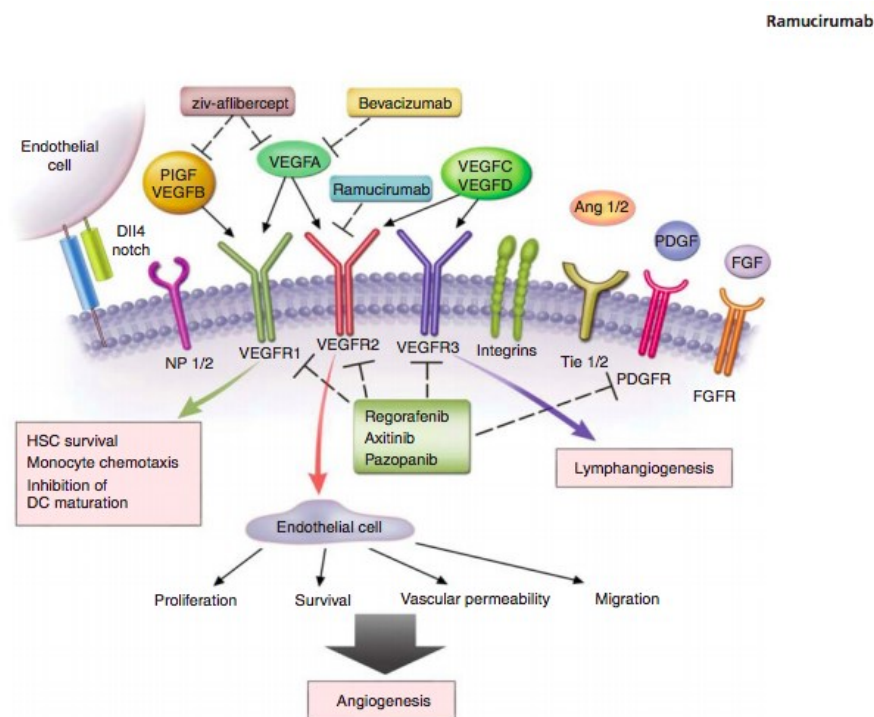
Tabuľka 3 Inhibítory kinázy schválené ako terapeutické činidlá. PDGFR-receptory rastových faktorov odvodené od trombocytov; c-KIT-receptorová tyrozínkináza; BCR-ABL-fúzny proteín (vznikajúci pri zlomoch chromozómov 9 a 22 a nachádzajúci sa u väčšiny pacientov s myelogénnou leukémiou); Src (sark) –gén (fungujúci ako nereceptorická tyrozínkináza); TKs- tyrozín kinázy; mTOR- cicavčí cieľ rapamycínu - serín/threoninová kináza regulujúci bunkový rast a proliferáciu; AKT- serín- threonin proteín kináza; Chk1- kontrolná kináza (zohrávajúca úlohy pri replikácii DNA a pri mitóze); ErbB- skupina receptorových tyrozínkináz; Aurora kinázy- serín/threoninové kinázy nevyhnutné pre bunkovú proliferáciu; EGFR- receptor epidermálneho rastového faktora; VEGF- vaskulárny endotelový rastový faktor. Upravené podľa. [18]

| Kinase inhibitors | Target structure |
|-------------------|-------------------------------|
| Imatinib | PDGFR, c-KIT |
| Nilotinib | BCR-ABL |
| Sunitinib | VEGFR1 +2, PDGFR, c-KIT |

| Kinase inhibitors | Target structure |
|--------------------------|-------------------------|
| Erlotinib | EGFR |
| Pazopanib | PDGFR VEGFR c-KIT |
| Sorafenib | Multikinase inhibitor |
| Cefitinib | EGFR |
| Saracatinib | Src |
| Danuserbib | Aurora kinase |
| Dasatinib | BCR-ALB Src |
| CP-868 | PDGFR |
| ABT-869 | Multiple receptor TKs |
| Vandetanib | EGFR VEGFR |
| Telatinib | VEGFR2 + 3 PDGFR |
| Axitinib | VEGFR 1, 2, 3 |
| Temsirolimus | mTOR |
| Everolimus | mTOR |
| Bevacizumab | VEGFR |
| Trastuzumab | HER2 |
| Masitinib | c-KIT |
| Triciribine | AKT |
| UCN-01 | Chk1 |
| Neratinib | EGFR HER2 |
| BIBW-2992 | EGFR HER2 |
| CI-1033 | ErbB |
| Lapatinib | EGFR HER2 |

3.7 Monoklonálna protilátka ramucirumab

Ramucirumab je plne humanizovaná monoklonálna IgG protilátka, zameraná na extracelulárnu doménu receptora pre VEGF typu 2 (VEGFR-2), čo je znázornené na **Obrázku 5**. Početné štúdie v rôznych malignitách ukázali sľubné klinické prejavy protinádorovej účinnosti a znášanlivosti tohto terapeutika. [21]



Obrázok 5. Vázba ramucirumabu na receptor VEGFR-2. NP1/2 – neuropilin (proteínový receptor fungujúci ako koreceptor z dôvodu veľmi malej cytoplazmatickej domény a tak spoliehajúci na iné molekuly pre transdukciu svojích signálov cez bunkovú membránu); VEGFR-1,2,3- vaskulárny endotelový rastový faktor typu 1, 2 a 3; FGFR - receptor fibroblastového rastového faktoru; FGF - fibroblastový rastový faktor; PDGFR - receptory rastových faktorov odvodené od trombocytov; PDGF - dimerický glykoproteínový rastový factor. Upravené podľa [21]

3.7.1 Klinické štúdie účinku mAb ramucirumab

V počiatočnej fáze I klinickej štúdie s ramucirumabom sa celkovo 37 pacientov liečilo dávkami v rozmedzí od 2 do 16 mg na kg infúziami týždenne. Sekvenčné merania následne potvrdili zníženú vaskulatúru nádoru u 69% pacientov. V roku 2010 boli vyhlásené prvé výsledky zo štúdie ramucirumabu u solidných malignít. Týždenne sa podával ramucirumab s počiatočnou dávkou 2 mg na kg až do dávky 16 mg na kg. U dvoch pacientov sa vyvinula hypertenzia, ktorá obmedzila dávkovanie a žilná trombóza kedy 13 mg na kg bola maximálna tolerovaná dávka. U asi 60% pacientov sa vyskytla toxicita tretieho stupňa doprevádzaná únavou a hypertenziou. Sľubná účinnosť bola zistená u 4 z 27 pacientov, u

ktorých došlo k čiastočnej odpovedi na liečbu. Ochorenie sa stabilizovalo u asi 73% pacientov pričom u 11 z 37 pacientov bolo ochorenie stabilne, alebo sa ukázala čiastočná odpoveď po 6 mesačnom sledovaní. Keďže výsledky prvej fázy boli sľubné konala sa druhá fáza po dobu 5 rokov na špecifických ochoreniach. Skúšali sa kombinácie ramucirumabu s chemoterapiami v prípadoch metastazujúceho melanómu, hepatocelulárneho karcinómu, atď. [18] [24]

V tretej klinickej fáze štúdie prebiehala štúdia pre účinnosť ramucirumabu na karcinóme žalúdka. Išlo o štúdiu REGARD, ktorá bola medzinárodná, placebom kontrolovaná dvojito slepá fáza, kedy sa hodnotil účinok ramucirumabu bezpečnosť jeho podania či už samostatného alebo v kombináciach. Celá štúdia mala 355 pacientov, ktorým bol v pomere 2:1 podávaný ramucirumab o množstve 8 mg na kg váhy a placebo každé dva týždne s najlepšou podpornou liečbou. Hlavným cieľom bolo celkové prežitie pacientov od začiatku liečby, sekundárne sa skúmala kvalita života a postup ochorenia (progresia). Priemerný vek bol 60 rokov, z toho 75% pacientov trpelo nádorom žalúdka s metastázami. Pacientom bol podávaný ramucirumab vo forme 4 infúzií po dobu 8 týždňov, kdežto pri placebe sa podali 3 infúzie po dobu 6 týždňov. Ramucirumab preukázal celkové prežitie na 5,2 mesiacov oproti placebo, kde to bolo len 3,8. Polročné prípadne ročné prežitie pacientov bolo v porovnaní 42% ku 18% ramucirumab: placebo. [21] [22]

Všeobecne platí, že ramucirumab bol veľmi dobre tolerovaný. Približne 10 % pacientov prerušilo liečbu ramucirumabom kvôli nežiaducim účinkom. Patrili tam napríklad hypertenzia, bolesť brucha, hyponatrémia či únava. Kombinovaná chemoterapia s ramucirumabem z druhej fázy štúdie všeobecne neprekázali významnú toxicitu. [21]

3.7.2 Štúdia na účinky, farmakodynamiku, farmakokinetiku a vplyv ramucirumabu na sérové biomarkery u solidných nádorov

Ďalšia štúdia o ramucirumabe skúmala bezpečnosť, maximálnu tolerovanú dávku, farmakokinetiku, imunogenicitu, protinádorovu aktivitu a farmakodynamiku. Pacienti s pokročilými malignými stavmi boli liečení dávkami ramucirumabu i.v. cez 1 hodinu. Krv bola vzorkovaná pre farmakokinetické štúdie behom liečby; boli hodnotené hladiny cirkulujúceho VEGF-A a rozpustných VEGFR-1 a VEGFR-2. Stredná doba liečby bola 12 týždňov. Neboli pozorované žiadne toxické účinky obmedzujúce dávku. Najčastejšie hlásené nežiaduce účinky zahŕňajú proteinúriu a hypertenziu každý 6. pacient a prujem, únava a bolesť hlavy každý 4. pacient. Údaje o stupni nežiaducích účinkov spojené s liečbou

boli: dve hypertenze 3. stupňa (10 a 20 mg / kg), jedno zvracanie 3. stupňa, únava (20 mg / kg), flutter sieni (15 mg / kg) a 4 krvácania duodenálneho vredu (6 mg / kg). [20.]

Farmakokinetická analýza odhalila nízku clearance a poločas rozpadu približne 110 až 160 h. Pätnásť pacientov (60%) malo najlepšiu odpoveď na stabilné ochorenie s priemerným trvaním 13 mesiacov. Ramucirumab bol dobre znášany. Výsledky štúdie viedli k doporučeným dávkám fázi II vo výške 8 mg / kg pri aplikácii každé dva týždne a 10 mg / kg každý tretí týždeň. Bolo preukazané, že väzba VEGF-A na VEGFR-1 a VEGFR-2 stimuluje neoangiogénu a permeabilitu nádorov. Zatiaľčo v klinickej praxi je používaných niekoľko anti-VEGF protilátok a mnohopočetných inhibítorov VEGFR tyrosinkinázy, hodnotilo sa len málo činidiel, ktoré priamo a špecificky inhibujú iba VEGFR-2. [20]

Preklinickými a klinickými štúdiami bolo preukázané, že ramucirumab znižuje permeabilitu, migráciu a proliferáciu endoteliálnych buniek. Sú charakterizované nízkym clearansom (CL), Vss (distribučný objem v ustalenom stave) v súlade s celkovým objemom krvi (~ 30-60 ml / kg) a dlhý biologický polčas 110 až 160 h. Po jednorázovej dávke ramucirumabu sa maximálna sérová koncentracie (Cmax) a plocha pod krivkou (AUC) všeobecne zvyšujú s očakávanou dávkou. [19] [20]

Koncentrácia VEGF-A sa bezprostredne po liečbe zvyšovala a všeobecne zostala zvýšená dvakrát až osemkrát oproti predchádzajúcim hodnotám po 7 dňoch. U pacientov liečených po viacerých cykloch vykazoval VEGF-A trvalé zvýšenie. VEGFR-1 zostala relatívne konštantná, aj keď niektorí pacienti vykazovali zvýšené hladiny. Koncentrácia VEGFR-2 mala tendenciu k poklesu po liečbe ramucirumabem. Pri opakovanom podávaní niektorí pacienti vykazovali hladiny VEGFR-2 o 40% až 100% vyššie než hladiny prekursoru. U všetkých sérových biomarkerov sa zdálo, že pozorované zmeny hladín nie sú závislé na dávke. V rámci klinickej štúdie bolo taktiež zistené, že z 25 pacientov, ktorí boli vyšetrení pred a po liečbe, traja pacienti vyvinuli anti-ramucirumabové protilátky. [24]

3.8 Biosenzory pre in vitro diagnostiku nádorových ochorení

Existujúce klinické diagnostické metódy zahŕňajú hlavne klinické zobrazovacie techniky a morfológickú analýzu bunky alebo tkaniva (cytológia alebo histopatológia). Tieto metódy však vykazujú pomerne nízku citlivosť, majú tendenciu spôsobovať nesprávnu diagnózu a preto nie sú vhodné pre včasnú detekciu nádorových ochorení. *In vitro* biosenzory využívajú vzorky krvi, moču alebo nádorových tkanív, ktoré obsahujú proteíny, DNA, RNA,

enzýmy, malé molekuly a celé bunky, aby slúžili ako špecifické biomarkery pre detekciu, sledovanie a prognózu nádorového ochorenia. [1]

Heterogénne biosenzory, najčastejšie používaný typ *in vitro* biosenzoru, spolieha na difúziu cieľových molekúl vo vzorku roztoku na pevný povrch pre generovanie signálu, kde detekčný signál môže byť oddelený od signálu pozadia premývacím krokom. Typickým príkladom heterogenného biosenzorového testu je test enzymového imun sorbentu (ELISA). Hlavným problémom heterogenných biosenzorov je však požiadavka na opakované kroky oddeľovania a premývania, čo robí analytický postup skôr časovo náročný a náročný na prácu, a je vo svojej podstate náchylnejší k chybám, ktoré môžu viesť ku chybnnej diagnostike nádoru. Testy biosenzoru bez premývania sa robia jednoduchým miešaním sond generujúcich signál s roztokom vzorku a produkcia detekovateľného signálu sa objavuje skôr v roztoku než na pevnom povrchu. V porovnaní s konvenčnými heterogennými biosenzormi sú najväťšími výhodami biosenzorov bez premývania to, že sú jednoduchšie, pohodlnejšie a rýchlejšie. Detekovateľné signály sa vytvárajú po väzbovej interakcii cieľových analytov a detekčných sond, čím sa vylúči potreba premývacieho kroku k oddeleniu signálu pozadia. [1]

3.8.1 Kolorimetrické biosenzory bez premývania

Kolorimetrické biosenzory sú založené na zmenách intenzity farieb indukovanej cieľovou skupinou, ktoré je možné ľahko rozlíšiť voľným okom pre kvalitatívny test alebo jednoduchou spektrometriou na kvantitatívnu analýzu, čo robí kolorimetrický biosenzor najdôležitejšou skúšobnou platformou na analýzu. [1]

Nanočastice z ušľachtilých kovov vrátane nanočastíc zlata (AuNP) a nanočastice striebra (AgNPs) sú triedou vynikajúcich signálnych indikátorov pre kolorimetrické biosenzory, pretože vykazujú špeciálnu lokalizovanú povrchovú plazmónovú rezonanciu (LSPR). Metóda rezonancie povrchových plazmónov (SPR) je rezonančná oscilácia vodivých elektrónov na rozhraní medzi negatívnym a pozitívnym permeabilným materiálom stimulovaným dopadajúcim svetlom. SPR je základom mnohých štandardných nástrojov na meranie adsorpcie materiálu na rovinné kovové (obvyčajne zlaté alebo strieborné) povrchy alebo na povrch kovových nanočastíc. Je základným princípom mnohých aplikácií biosenzorov na báze farieb a rôznych snímačov. LSPR (lokalizované SPR) sú kolektívne oscilácie elektrónového náboja v kovových nanočasticiach, ktoré sú vybudené svetlom. Zvýšenie intenzity svetla je veľmi dôležitým aspektom LSPR a lokalizácia znamená, že

LSPR má veľmi vysoké priestorové rozlíšenie obmedzené len veľkosťou nanočastíc. Zrejme zmeny farby nanočastíc ušľachtilých kovov sa dajú ľahko dosiahnuť zmenou veľkosti nanočastíc, morfológiou a medzičasticovými vzdialenosťami. [1]

3.8.2 Fluorescentné biosenzory bez premývania

V porovnaní s biosenzormi založenými na absorbancií sú fluorescenčné biosenzory citlivejšie. Bežné fluorescenčné testy používajú enzýmy na katalyzovanie fluorogénnych substrátov pre generovanie detekovateľných fluorescenčných molekúl ako výstup signálu. Avšak bežné organické fluorogénne substráty trpia pomerne nízkou intenzitou luminiscencie, čož je fyzikálny jav, pri ktorom teleso vyžaruje väčšie množstvo svetla, než by vyžarovalo absolútne čierne teleso rovnakej teploty a je spôsobená prechodmi vybudných elektrónov do základného stavu po excitácií. Látka, schopná luminiscencie sa potom nazýva luminofor. Najmä s rýchlym rozvojom nanovied a nanotechnológií sa objavila široká škála fluorescenčných bioplynov bez premývania s vynikajúcou citlivosťou, špecifickosťou a jednoduchou operáciou na *in vitro* detekciu nádorových biomarkerov. [1]

3.8.3 Chemiluminiscentné biosenzory bez premývania

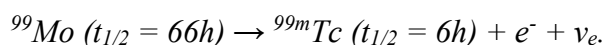
Luminiscencia môže byť prebiehajúca chemická reakcia, kde excitácia ide na úkor energie uvoľňovanej reakciou. Tento prípad sa zohľadňuje aj v názve, označuje sa ako chemiluminiscencia (CL). Pri takýchto reakciách vzniká medziprodukt v tzv. vzbuđenom stave a prebytočná energia sa vyžaruje v podobe fotónov. Chemiluminiscencia je generovanie elektromagnetického žiarenia vo viditeľnej alebo blízkej infračervenej oblasti. CL fenomény môžu prebiehať vo vodných fázach alebo v pevných fázach. Počas procesu reakcie CL je vyrobený elektrický excitovaný medziprodukt nestabilný a uvoľňuje sa do základného stavu so svetelnou emisiou. Ako silná analytická metóda má metóda CL vysokú citlivosť, dobrú špecifickosť, rýchlu analýzu, jednoduchú operáciu, široký lineárny rozsah. Ako taká sa objavuje CL v roztoku v posledných rokoch ako hlavná analytická platforma pre citlivú detekciu rôznych cieľových analytov v klinickej diagnóze z dôvodu jej jednoduchosti, rýchlosti a metódy bez premývania. [1]

3.9 Nukleárna fyzika v diagnostike a liečbe nádorov

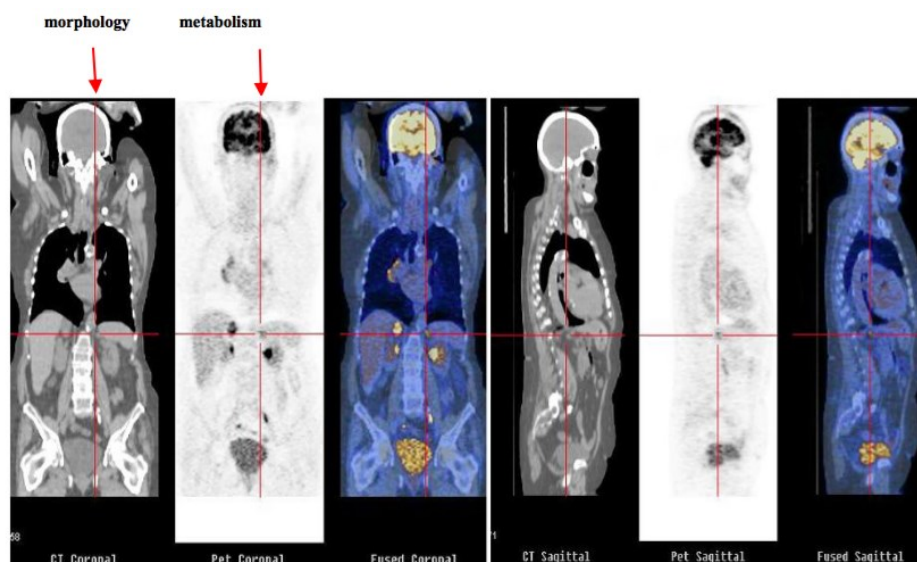
Iba 1% z 18.000 svetových urýchl'ovačov sa venuje výrobe rádioizotopov pre lekársku diagnostiku. V skutočnosti sa v súčasnej dobe k približne 85% všetkých lekárskech vyšetrení

používa radionuklid ^{99m}Tc pripravovaný v jadrových reaktoroch. V rámci radioterapie sa v rozvinutých krajinách každoročne ožaruje približne 20.000 pacientov s onkologickým ochorením pomocou vysokoenergetických fotonov (tzv. Röntgenové lúče). Oveľa menej sa používa "hadrontoterapia", technika rádioterapie, ktorá používa protóny, neutróny alebo izotopy uhlíka. Protóny a ióny sú "ťažké" nabité častice, ktoré zaisťujú viac "konformné" ošetrovanie ako röntgenové lúče, a tým ušetria lepšie okolité zdravé tkanivá, a tým umožňujú použitie väčšej dávky. Hranicou rádioterapie je teraz použitie lúčov uhlíkových iónov. Dodávajú dávku presne ako protóny a majú väčšiu biologickú účinnosť ako röntgenové lúče a protóny, aby boli obzvlášť vhodné na liečbu nádorov, čo dokazujú veľmi povzbudivé výsledky získané u približne 2.000 pacientov v HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba), čož je akcelerátor pre terapiu nádorov.[5]

V súčasnosti sa stále používa u 85 % všetkých lekárskech rádioizotopových vyšetrení radionuklid ^{99m}Tc vďaka svojim mnohým výhodám popísanými vyššie. Technécium sa získava buď zo štiepných produktov, alebo najčastejšie z rozpadu rádioaktívneho molybdénu (materského prvku) produkovaného pomalými neutrónmi v jadrovom reaktore. Radioaktívny rozpad materského jadra molybdénu na dcérske jadro technécia, ktorý sa odohráva v prenosnom a dobre stienenom generátore, je nasledujúci:



Gama žiarenia uvoľnené zo vzбудeného jadra ^{99m}Tc je registrované pomocou SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) kamery.[5]

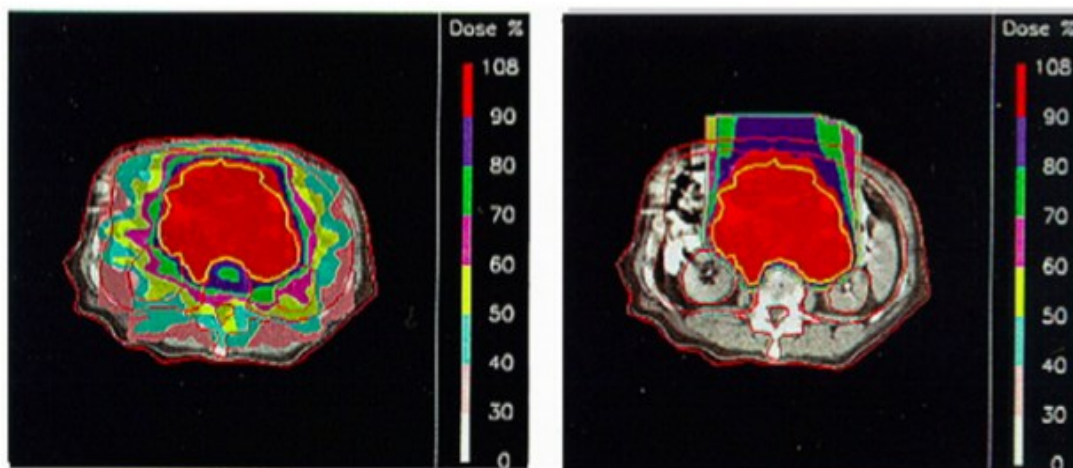


Obrázok 6. Porovnanie CT metódy, ktorá zobrazuje morfológiu, a PET metódy zobrazujúcej metabolizmus. Kombináciou oboch získavame CT/PET snímok, ktorý sa v dnešnej diagnostike používa najčastejšie. Upravené podľa [5]

Pre PET (Positron Emission Tomography) meranie je najpoužívanější izotop ^{18}F viazaný v glukóze, ktorá je rýchlo metabolizovaná nádorovými a zapálenými bunkami. V súčasnosti sú dostupné zariadenia novej generácie, ktoré kombinujú počítačovú tomografiu (CT) s lúčmi X a pozitronovou emisnou tomografiu ako to je zobrazené na **Obrázku 6**, kedy na pozadí morfologického zobrazenia vďaka CT sa zobrazujú signály z PET žiaričov v mieste ich akumulácie. [5]

3.9.1 Protonoterapia

Energie na dosiahnutie hlboko sediacych nádorov je rádovo 200 MeV pre protóny a 4.800 MeV pre izotopy uhlíka, takže priemerne v každej bunke uhlíkový ión púšťa 24-krát viac energie ako protón, ktorý má rovnaký dosah. Energia potrebná pre urychlenie protónov sa môže získať buď v zariadeniach cyklotrónov alebo synchrotrónov (konkrétny druh kruhového urychlovača častíc v ktorom je magnetické pole a elektrické pole). Biologické účinky protónov sú prakticky totožné s biologickými účinkami lúčov X. Väčšina odborníkov tvrdí, že protonoterapia pre približne 1 % všetkých pacientov, ktorí sú v súčasnosti ožiarení röntgenovými lúčmi, je oveľa lepšou liečbou. Porovnanie liečebných plánov tejto metódy je uvedené v **Obrázku 7**. [5]



Obrázok 7. V pravo je uvedený protónový liečebný plán, ktorý je lepší ako liečba IMRT (radioterapia modulovaná intenzitou), ktorá používa 9 röntgenových lúčov a je zobrazená v ľavo. Upravené podľa [5]

3.9.2 PET a SPECT

Anatomické zobrazovacie metódy, ako je počítačová tomografia, magnetická rezonancia a ultrazvuk, sú klinicky významné zobrazovacie techniky s vysokým rozlíšením, ktoré sú vhodné na odhalenie štrukturálnych abnormalít. Avšak rozlíšenie benígnych od malígnych lézií je stále ťažké. Funkčné zobrazovacie metódy, ako napríklad pozitronová emisná tomografia, môžu stanoviť metabolické alebo funkčné parametre tkaniva, ktoré môžu pomôcť pri tomto rozlišovaní. Absorpcia ^{18}F -FDG (fluorodeoxyglukózy) v rôznych orgánoch sa u pacientov líši. Bol navrhnutý a vyrobený PET-CT skener na báze rotačného počítača s CT rotorom tretej generácie a PET skenerom. Význam spočíva v získaní projekcie z oboch zariadení, ktoré sa kombinujú do jedného spoločne zaregistrovaného obrazu. Funkčné zobrazovanie získané pomocou PET, ktoré znázorňuje priestorové rozloženie metabolickej alebo biochemickej aktivity v tele môže byť presnejšie zarovnané alebo korelované s anatomickým zobrazením získaným pomocou CT skenovania.[26]

Záhadný názov SPECT je skratka z anglického názvu "Single Photon Emission Computed Tomography", čo v slovenčine znie "jednofotónová emisná výpočtová tomografia". Ide o zobrazovaciu metódu z odboru nukleárnej medicíny, ktorá dokáže zobraziť priestorové rozloženie nejakej rádioaktívne značenej látky v tele, táto látka je pred zobrazením do organizmu podaná najčastejšie vnútrožilne. [23]

Metóda SPECT vychádza z dvojrozsmernej scintigrafie a z pohľadu pacienta, teda priebehom vyšetrenia, sa od nej príliš nelíši. Je však obohatená o výpočtový systém, ktorý dokáže z mnohých obrazov nasnímaných z rôznych uhlov zrekonštruovať trojrozmerný

obraz. Narozdiel od röntgenových metód, ktoré zobrazujú telesné štruktúry, sa táto metóda sústreďí na zobrazenie funkcie daných orgánov. SPECT používa pre zobrazenie ľudských tkanív rovnakého princípu, ako scintigrafia, čo je metóda, ktorá zobrazuje rozloženie určité látky v tele. Toho sa docieli tak, že sa pacientovi podá do tela látka, ktorá je rádioaktívna. Pacientovi sa môže podať každá látka, ktorá je bežne prítomná v našom tele a má v ňom nejakú funkciu, len sa určitý atóm v tejto zlúčenine zamení za atóm rádioaktívny. Takto zmenená látka sa označuje ako radiofarmakum. Rádioaktívny atóm je v čase nestabilný, má tendenciu sa premeniť na atóm nesúci nižšiu energiu a prebytočná energia sa, v prípade látok používaných pri scintigrafii, pritom vyžiari vo forme takzvaného gama žiarenia. Za určitý čas sa takto premení určité percento z celkového počtu rádioaktívnych atómov čas, za ktorý sa premení 50% atómov, sa nazýva polčas premeny. Ako radiofarmaka sa väčšinou používajú rádionuklidy s krátkym polčasom, takže za niekoľko hodín nanajvýš dní prestanú byť rádioaktívne. [23]

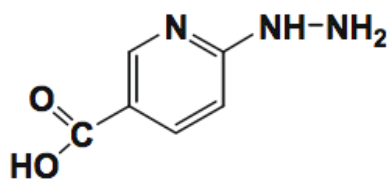
Pre zobrazenie rozloženia radiofarmaka v tele je predovšetkým dôležité žiarenie, ktoré je týmito atómami vysielané. To je totiž zachytené špeciálnym detekčným zariadením, scintilačnou kamerou a vytvorí sa tak obraz sledovanej oblasti, kde sú zvýraznené oblasti s vysokým obsahom radiofarmaka. Táto metóda tak zobrazuje hlavne funkciu tkanív - odhalíme tak bunky, ktoré danú látku zvýšene hromadia, alebo naopak bunky, ktoré "zaostávajú" a nedokážu danú látku absorbovať. Tento takzvaný stopovacie princíp, ako sa nazýva detekcia chemických látok pomocou ich rádioaktivity, bol prvýkrát objavený maďarským chemikom Hevesym v roku 1913. Jeho podstatou je, že látka sa chemicky chová úplne rovnako, ako daná látka s rádioaktívnou formou toho istého atómu. Tieto atómy sa označujú ako izotopy - líšia sa iba počtom neutrónov v jadre, majú ale rovnaký chemický názov. Ich správanie v organizme je tiež identické. [23]

Pre snímanie konkrétného výrezu pacientovho tela z viacerých uhlov sa používa tzv. 3D (trojrozmerná) SPECT. Týmto spôsobom vzniká viacero projekcií ktoré, sú počítačom premenené na obraz konkrétného rezu, spojením týchto rezov vzniká konečný 3D obraz.

Jednou z nevýhod projekcie je slabšia presnosť čo je dôvod prečo sa začala SPECT metóda kombinovať s výpočtovou tomografiou, ktorá má presnejšie rozlíšenie. Ide o dvojité SPECT- CT prístroje. [28]

3.10 Nepriame radioaktívne značenie monoklonálných protilátok za použitia chelatačného činidla HYNIC

Molekula kyseliny 2-hydrazinonikotinamidu (HYNIC) uvedená na **Obrázku 8** je účinným bifunkčným chelátorom. Existuje priame značenie (pomocou nativného cysteínu) a nepriame značenie (pomocou BFC bifunkčných chelátorov). HYNIC bola jedným z najpopulárnejších a najúčinnnejších BFC používaných na tento účel. HYNIC sa dokáže koordinovať s kovom prostredníctvom maximálne 2 darcovských skupín (pyridylovy dusík a hydrazinový dusík). Pretože molekula HYNIC není schopna nasýtiť koordinačnú sféru naviazaného rádionuklidu ako napríklad technécia, koordinácia musí byť dokončená za použitia ďalších tzv. koligandov. Ako koligandy sa používajú napríklad kyselina nikotinová, tricin, kyselina ethylendiamin dicotová (EDDA), mannitol atď. [13]



Obrázok 8. Molekula kyseliny 2-hydrazinonikotinovej (HYNIC).

Pri nukleofilných atakoch je potrebná ochrana estérových väzieb na molekule HYNIC, napríklad pomocou lyzínu. Ničmenej, hydrazinová skupina je silnejší nukleofil ako lyzin. Najčastejšie sa využíva tzv. Boc (butoxykarbonylová kyselina) skupina, ktorej odstraňovanie prostredníctvom HCl alebo kyseliny trifluoroctovou nemusí vyhovovať všetkým bielkovinám. [13]

Pre ochranu hydrazínovej skupiny sa skúmali tri látky, pričom Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl chlorid) vykazovala nízky výtťažok konjugátu hynic-peptid, druhá Cbz (karboxybenzyl) vykazovala výtťažok vysoký, ale deprotekcia niektoré bielkoviny mohla poškodzovať. Preto sa najviac ujala ochrana hydrazínovej skupiny prostredníctvom vytvorenia hydrazónu pomocou aldehydu ako tretej skúšanej látky, ktorý by bol dostatočne stabilný aby zablokoval vznik formaldehyd-hydrazónu, ale aby sa zároveň dal jednoducho nahradiť ^{99m}Tc pri značení. Zistilo sa, že všeobecne sú aromatické aldehydy a ketóny

odolnejšie voči vzniku formaldehydu ako alifatické látky najmä benzaldehyd. Ďalšie skúmanie potom odhalilo, že najvýhodnejšie je používanie Boc skupiny na ochranu hydrazínovej skupiny. Deprotekcia prebieha potom cez trifluoroctovú kyselinu, ktorá nielenže odstráni Boc z hydrazínovej skupiny, ale vytvorí aj trifluoracetylhydrazidový derivát, čo vedie k záveru o vynikajúcej ochrane proti reakciám hydrazínovej skupiny s aldehydami. Zároveň sa dá veľmi dobre odstrániť za miernych podmienok. [13]

Jeden z možných rádionuklidov, ktorý sa viaže na HYNIC, je už zmieňované ^{99m}Tc , kde "m" v hornom indexe označuje metastabilný, čiže je jeho jadro v energeticky excitovanom stave, ktoré sa následne deexcituje pomocou emisie nadbytku energie v podobe fotónu gamma žiarenia na nuklid ^{99}Tc , ktorý má polčas rozpadu 106000 rokov. ^{99m}Tc sa v nukleárnej medicíne používa na označenie biomolekúl pre molekulárne zobrazovanie. Rádionuklid ^{99m}Tc bol hlavným pilierom diagnostickej nukleárnej medicíny asi pol storočia. Na začiatku 90. rokov došlo k rozvoju niekoľkých prístupov značenia biomolekúl s ^{99m}Tc . Okrem neho sa môže viazať ešte napríklad ^{64}Cu , ktorého využitie v posledných niekoľkých rokoch s obľubou narastá. [13]

3.10.1 Koligandy radioaktívneho značenia cez chelátor HYNIC

Keďže HYNIC sám o sebe nemôže dokončiť koordinačnú sféru napríklad ^{99m}Tc , sú potrebné pridružené koligandy ako je glukarat, mannitol, glukamín, tricín, glukohexonát, alebo EDDA. S výnimkou EDDA, sú ostatné chelatačné ligandy, ktoré tvoria kineticky nestabilné komplexy, skôr slabé. Tieto ligandy sú potenciálne citlivé na výmenu ligandov *in vivo*, čo vedie k možnosti endogénnych ligandov, ako sú proteíny, ktoré sa viažu na technécium a tým nepriaznivo ovplyvňujú biodistribúciu. Výmena ligandov tiež ponúka možnosť nahradiť ich silnejšími chelátormi. Napr. tricín je obvyčajne vylúčený zo značených komplexov prídáním EDDA, kyselinou nikotínovou alebo isonikotínovou kyselinou. Výsledný ^{99m}Tc -konjugát je stabilnejší. Značené komplexy s tricínom ako koligandom sú nehomogenné, skladajú sa z niekoľkých druhov obsahujúcich jeden až dva tricíny v rôznych izomerných formách. Sekundárne koligandy ako EDDA alebo kyselina nikotínová znižujú počet prítomných druhov. Zmena koligandu môže významne ovplyvniť biodistribúciu. Z koligandov bežne používaných není žiaden ideálny. Tricín sa zdá byť priaznivý pre počiatočné zníženie a komplexovanie technécia. EDDA na druhej strane produkuje stabilnejšie komplexy s menej izomermy, ale je menej účinný pri tvorbe značeného

komplexu. Iné ligandy (nikotinamid, isonikotinamid) nie sú chelátové, čo umožňuje relatívne ľahkú výmenu ligandu a následnú sérovu nestabilitu. [13]

4 Experimentálna časť

4.1 Prístroje a software

- analytické váhy (Sartorius Analytic)
- automatické pipety (v pipetovacím rozsahu 0,5–10 µl, 2–20 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl; Ependorf Research plus)
- bunkový inkubátor (Sartorius Stedim Biotech, Certomat® CS-18)
- Bürkerova počítacia komôrka pre kvantifikáciu buniek (Brand)
- detektor povrchovej kontaminácie (POLON)
- detektor radioaktívneho žiarenia (Bq Metr 4, BQM)
- digestor (POLON)
- Gamma (γ) Counter (Automatic Gamma Counter, Waltec Wizard2 3", 2480 Perking Elmer)
- HPLC systém (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Inc.) s radiometrickou detekciou
- bunkový inkubátor (SANYO MIR-153)
- nesterilní bunkový inkubátor (Dry-Bath, MS Science)
- iTLC-analyzátor RITA Star (Raytest)
- laminárny box (Bio Air Instruments)
- magnetické miešadlo (IKA RTC basic)
- Microsoft Office Excel (Professional plus 2016)
- mikroskop (XDS-IR, OPTICA)
- multidávková pipeta (0,5-50 ml, Handy step, Brand)
- multikanálová pipeta (Comfort)
- pH meter (Eutech Instruments pH510)
- program GraphPad Prism 7.03
- program TraceDrawer (Ridgeview AB)
- predvážky (Kern PLB 200-3)
- prístroj LigandTracer Yellow (Ridgeview AB)
- sklenená Pasteurova pipeta (Brand)
- spektrofotometer (TECAN INFINITE M200 PRO)
- trepačka (Vortex V1 plus Biosan)
- ultrazvuková kúpeľ (Ecoson Ultrasonic Engineering)

- vodná kúpeľ (Julabo, TW12)

4.2 Použitý material

- centrifugačná skúmavka (50 ml, TPP)
- HPLC kolona (BIOSil Sec 250, 300 x 7,8 mm, BioRad Gel column)
- iTLC-SG (Glass microfiber chromatography paper impregnated with silica gel, Varian)
- kolonka na prečistenie na základe elúcie pôsobením gravitácie (Illustra™ NAP 5 Column Sephadex™ G-25 DNA Grade)
- kultivačná fľaša (75 cm² a 182 cm², TPP)
- Petriho misky (92 x 17 mm, Nuclon Delta surface)
- pipetovacie špičky (Eppendorf)
- sérologické jednorázové pipety (o objemoch 5, 10, 25 ml; TPP)
- 24- a 96-jamkové doštičky (TPP)

4.3 Použité chemikálie

- argon (Linde Gas a.s.)
- CaCl₂ (Penta)
- BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)
- bovinné fetálne sérum (FBS-Sigma-Aldrich)
- bovinný sérový albumin (BSA-Sigma-Aldrich)
- 70 % etanol (Penta)
- fosfátový pufr (PBS)
- glukóza (Penta)
- glycin (Sigma-Aldrich)
- glycinový pufr (pH 2,8)
- 37 % HCl (Sigma-Aldrich)
- Hepes (4(2- hydroxyethyl) piperazine-1- ethanesulfonic acid; Sigma-Aldrich)
- KCl (Penta)
- kultivačné médium pro SKOV3 buňky (McCoy 5 A, Sigma-Aldrich)
- L-glutamin (200 mM; Sigma-Aldrich)
- MgCl₂ (Penta)
- NaCl (Penta)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Penta)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Penta)
- NaN_3 (Sigma-Aldrich)
- NaOH (1 M, Penta)
- ramucirumab - infúzny roztok (CYRAMZA 40 ng/ml, ELI LILLY)
- roztok neesenciálnych aminokyselin pre bunkovú kultiváciu (Sigma-Aldrich)
- S-HYNIC crosslinker (succinimidyl-6-hydrazine-nicotamide (A 252), sukcinimidyl-6-hydrazin-nikotinamid (A 252), Synlinker)
- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, technecistan sodný (GE Healthcare, DRYTEC™)
- Trypsin EDTA roztok (Sigma-Aldrich)
- TritonX (Sigma-Aldrich)
- ultra čistá voda (Millipore)

4.4 Použitý biologický material

Bunková línia SKOV3 (Human Caucasian Ovary Adenocarcinoma, bunky ľudského ovariálneho adenokarcinomu), produkcia ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures).

4.5 Pracovný postup

4.5.1 Príprava citratového pufru

Pre prípravu citratového pufru, ktorý bol použitý ako mobilná fáza u iTLC, boli pripravené dva roztoky, ktoré boli následne zmiešané. Pre prípravu roztoku (A) bolo navážené 2,14 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ a rozpustené v 100 ml destilovanej vody. Pre prípravu roztoku (B) bolo navážene 2,94 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ a rozpustené v 100 ml destilovanej vody. Výsledný citrátový pufr o pH 5 bol vytvorený zmiešaním 35 ml roztoku (A) a 65 ml roztoku (B). Takto pripravený pufr bol uchovávaný v chladničke.

4.5.2 Príprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr (PBS) sa používa k udržaniu konštantného pH v neutrálnej oblasti, prípadne ľahko zásaditého. Pre experimentálnu časť práce bol pripravený 1 l roztoku PBS o pH 7,4. K príprave tohto pufru bolo navážené 8,01 g NaCl , 1,56 g NaH_2PO_4 , ktoré boli následne rozpustené v 200 ml destilovanej vody. Ďalšími komponentami roztoku boli navážky 0,21 g KCl a 3,58 g Na_2HPO_4 do 800 ml destilovanej vody. Oba pripravené roztoky

boli zmiešané a ich pH upravené na 7,4 pridávaním NaOH (1 M) za súčasnej kontroly pomocou pH metru. Pripravený PBS sa uchovával v chladničke.

4.5.3 Príprava Krebs-Ringerovho roztoku

Príprava Krebs-Ringerovho roztoku je dôležitá pre *in vitro* experiment, kedy sa tento roztok použil ako médium, v ktorom bola k bunkám pridavaná radioaktívne značená protilátka. Pre prípravu 2 l roztoku bolo potrebné vziať 14,32 g NaCl, 0,805 g KCl, 0,266 g CaCl₂, 0,325 g MgCl₂ * 6H₂O, 0,573 g Na₂HPO₄ * 12H₂O, 0,064 g NaH₂PO₄ * 2H₂O, 1,980 g glukózy a 4,766 g Hepes. Po navážení a rozpustení navážiek vyššie uvedených chemikálií, bolo pomocou roztoku NaOH (1 M) upravené pH na hodnotu 7,4 za kontroly pH metrom. Pripravený roztok bol uchovávaný v chladničke.

4.5.4 Kultivácia bunkových línií SKOV3

V experimentálnej časti diplomovej práce sme používali bunkové línie SKOV3. Tieto bunky sa v prvom rade kultivovali v kultivačných fľašiach o veľkosti 182 cm². Na kultiváciu sa použilo kultivačné médium McCoy 5A pre tieto bunky s obsahom FBS (10%) a L-glutamínu (2 mM). Bunky sa inkubovali v inkubátore pri teplote 37°C so vzdušnou vlhkosťou a s 5 % CO₂. Pri presádzaní buniek bolo najprv odsaté médium, potom sa bunky pomocou trypsínu (2 ml) preplachli, trypsin sa odpipetoval a následne sa opäť pridalo 5 ml trypsínu a bunky sa následne presadili do novej kultivačnej fľaše a v prípade ich prípravy na experiment sa nasadili do misiek či doštičiek použitých k experimentu. Bunky boli takto nasadené do experimentálneho kultivačného plastu 48 hodín. Ich presný počet bol určený pomocou Bürkerovej komôrky.

V prípade nasadenia buniek na Petriho misky pre experimentálne meranie robené na prístroji LigandTracer Yellow, boli bunky nasadené v počte 1 milión buniek do malej výseče naklonenej Petriho misky. V naklonenej Petriho miske boli bunky inkubované pri 37°C a 5 % CO₂ do dňa použitia v *in vitro* experimentoch.

Okrem toho bola časť buniek nasadená aj do 24-jamkovej doštičky v množstve 1 x 10⁵ buniek na jamku a tie boli tiež inkubované do doby experimentu pri teplote 37°C a atmosfére 5 % CO₂.

4.5.5 Konjugácia HYNIC s ramucirumabom

Prvým krokom bola príprava roztoku S-HYNIC v bezvodom DMF (dimetylformamide) kde sa zmiešal 1 mg HYNIC s 1 ml DMF. Až potom sa do roztoku

monoklonálnej protilátky ramucirumab (1000 µg) pridalo po kvapkách 8 µl roztoku HYNIC (1 mg/mL) z prvého kroku a miešalo sa to 2,5 hodiny za temna, takže konjugát derivátu HYNIC s humánnou protilátkou bol pripravený rozpustením 4 molarného nadbytku sukcinimidyl-6-hydrazino-nikotinamidu voči počtu molom ramucirumabu. Po ukončení inkubácie, aby sa odstranila nekonjugovaná frakcia HYNIC, bola reakčná zmes prečistená na kolonke NAP-5 Column pomocou PBS ako mobilnej fázy. Zachytená frakcia obsahujúca konjugát HYNIC-ramucirumab bola rozdelená na menšie alikvóty a tie boli zamrazené do doby ich použitia v experimentoch. [27]

4.5.6 ^{99m}Tc značenie konjugátu HYNIC-ramucirumab

Konjugát HYNIC-ramucirumab bol radioaktívne značený radionuklidom ^{99m}Tc . Radioaktívne značenie prebiehalo reakciou s $^{99m}\text{Tc}(\text{TcO}_4^-)$, čerstvo pripraveného (eluovaného z ^{99}Mo - ^{99m}Tc generátoru) do fyziologického roztoku. Pri radioaktívnom značení sa k HYNIC-ramucirumab (100 µg) pridalo $^{99m}\text{Tc}(\text{TcO}_4^-)$ s aktivitou 20 MBq, ďalej SnCl_2 (20 mg) a EDDA (80 mg). Pripravená reakčná zmes bola inkubovaná 30 minút pri 37°C za temna. Bezprostredne po inkubácii bol k zmesi pridaný chlorid horečnatý MgCl_2 (4,4 µg) pre stabilizáciu štruktúry monoklonálnej protilátky. Pripravený radiopreparát ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab bolo možné následne použiť k experimentom bez nutnosti čistenia vzhľadom k výsledkom stanovenia radiochemickej čistoty. [27] [29]

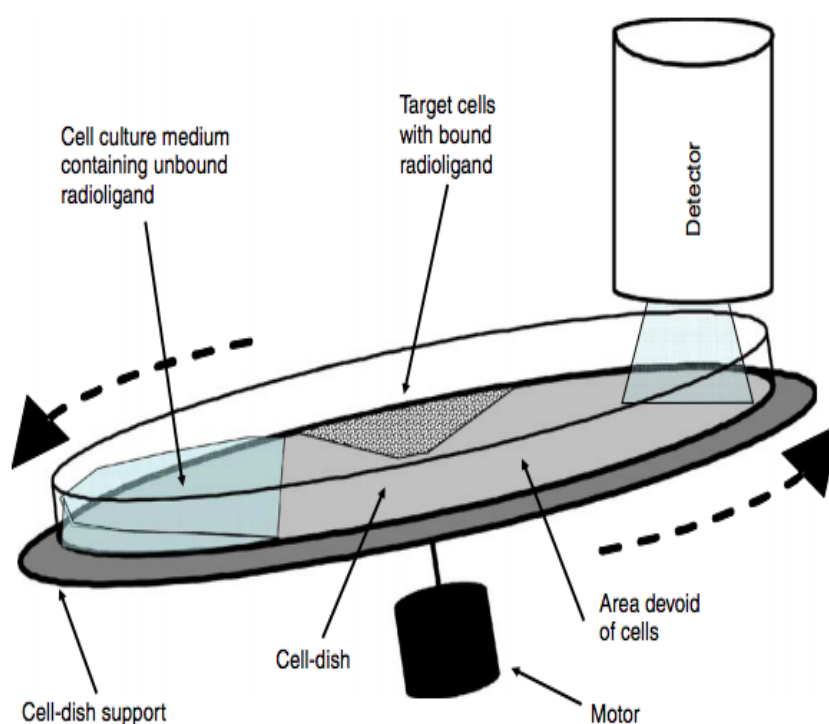
4.5.7 Stanovenie radiochemickej čistoty pomocou HPLC

Prostredníctvom metódy HPLC s radiometrickou detekciou a s použitím chromatografickej kolony BIOSil Sec 250, 300 x 7,8 mm sa stanovila radiochemická čistota ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab. Na kolonu sa aplikovala zmes vzorku ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab o objeme 40 µl a k nej sa pridalo 80 µl mobilnej fázy (0,05 M NaCl a 0,01 M NaN_3). Táto zmes bola napipetovaná do vzorkovej fľaštičky, umiestnená do dávkovača a následne systémom HPLC aplikovaná na kolonu v objeme 100 µl. Analýza vzorku prebiehala po dobu 35 až 45 minút pri prietoku mobilnej fázy 0,5 ml /min. Výsledkom bol chromatogram, v ktorom sa eluovala protilátka a prípadne nenaviazané technécium. Pre prípad prítomnosti voľného ^{99m}Tc vo vzorku bola urobená samostatná elúcia roztoku technecistanu za rovnakých podmienok merania ako pre radiokonjugát.

4.5.8 Stanovenie radiochemickej čistoty pomocou iTLC

Ako ďalšiu metódu k overeniu radiochemickej čistoty sme použili iTLC. Vzorka značeného radioligandu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu bola napipetovaná na štart chromatografického pružku potiahnutého silikagelom o objeme 2,5 μl . Po zaschnutí škvŕny s nanosenou vzorkou bol chromatografický pružok vyvíjaný v citrátovom pufre o pH 5 a následne detekovaný pomocou analyzátoru RITA Raytest.

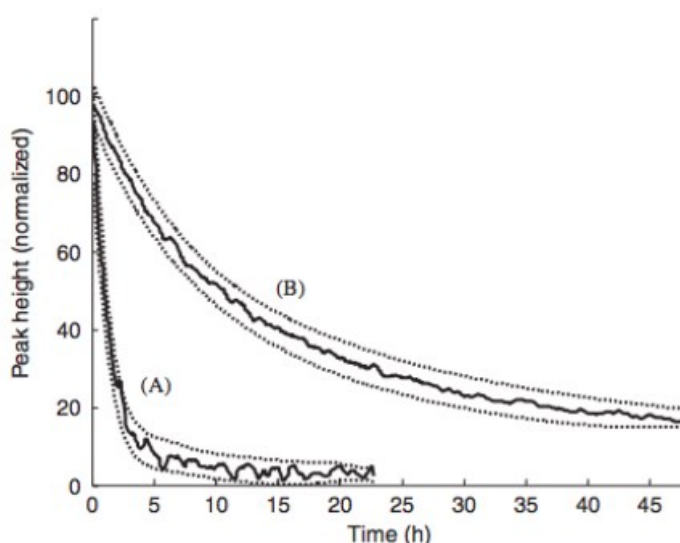
4.5.9 Meranie väzby radioligandu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na VEGFR 2 pomocou radioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase



Obrázok 9. Schéma princípu merania signálu z miest so špecifickou väzbou značeného ligandu (oblasť s bunkami) a signálu nešpecifickej väzby (referenčná oblasť bez buniek). Upravené podľa [12]

Princíp metódy merania automatickej radioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase, kedy cieľová štruktúra (bunkový receptor) je v špecifickej výseči Petriho misky umiestenej na rotujúcej platforme, je znázornený na **Obrázku 9**. V prípade *in vitro* merania za použitia buniek so špecifickým antigénom cieleným radioaktívne značenou mAb, je bunková línia nasadená v menšej výseči povrchu misky, kde dochádza k špecifickej väzbe (SB) značenej mAb na cieľovú bunkovú štruktúru. Na opačnej strane Petriho misky je oblasť bez buniek, ktorá slúži ako referenčná pre meranie prípadnej nešpecifickej väzby (NSB). Výsledný

signál, ktorý je zobrazovaný v grafe závislosti viazanej aktivity (radioaktívne značené mAb) voči prebehlému času, je reprezentovaný hodnotou signálu SB korigovanej na signál NSB meraný v referenčnej oblasti. Vlastné meranie prebieha tak, že detektor umiestnený vo veku prístroja premeriava zadané miesta (miesta pre SB a NSB) na Petriho miske v určitých časových intervaloch podľa toho, ako sa otáča rotujúca platforma. Rotácia Petriho misky umožňuje oplach povrchu kultivačnej misky a tým miest s bunkami (pre SB) a bez buniek (pre NSB) kultivačným médiom, ktoré obsahuje radioaktívne značený ligand. Intervaly rotácií a s tým súvisiaceho merania a jednotlivé dĺžky vlastného premeriavania aktivity v daných oblastiach si užívateľ definuje sám v ovladačom programe. [12]



Obrazok 10. Príklad výsledku real-time merania pomocou prístroja LigandTracer. Real-time krivka interakcie značeného EGF s bunkovým EGFR (krivka A) a interakcia mAb trastuzumab s bunkovým HER2 receptorom na bunkách SKOV3 (krivka B). Pevná čiara predstavuje priemer troch meraní. Bodkované čiary zobrazujú maximálnu chybu v každom časovom bode v rámci troch meraní. Výsledný graf merania poskytuje informáciu o rýchlej disociácii značeného EGF z väzby na EGFR. Hladina väzieb sa stabilizuje po ôsmich hodinách a po ôsmich hodinách tu stabilizovanú hladinu tvorí iba 10% z počiatočných väzieb. To znamená, že 90 % väzieb sa disociovala. V porovnaní trastuzumab s väzbou na HER2 mal pomalší priebeh. Vďaka silnejšej interakcii medzi mAb a HER2 mala disociácia pomalší priebeh. Vďaka tomu sa tak behom 24 hodín rozpadlo cca 70% väzieb. Kdežto v prípade interakcie EGF a EGFR došlo k rozpadu väzby behom 7 hodín, kedy sa rozpadlo okolo 90% väzieb. Upravené podľa [12]

Existujú štyri hlavné výhody rotujúcej real-time radioimunoanalýzy, pro ktoré bola táto metóda vybraná na stanovenie afinity radioaktívne značenej protilátky. Detekcia prebieha v reálnom čase príklad výsledku je uvedený na **Obrázku 10** a vedie tak k väzbe s vysokým rozlíšením trasovania, čož je nedosiahnuteľné pri použití ručných metód označovaných ako end-point meranie. Za použitia spätnej väzby v reálnom čase takisto dáva operátorovi okamžitý dôkaz, že experiment pracuje a akékoľvek kritické operačné chyby môžu byť objavené v počiatočnej fáze. Ďalej tato technika vyžaduje iba zlomok činidiel, buniek a pracovnú dobu v porovnaní s manuálnym protokolom. Real-time merania môžu prebiehať bez dozoru cez noc alebo víkendy a znižujú vystavenie pozorovateľa radioaktívnemu žiareniu na minimum, pokiaľ sa použije pre označenie sledovaného ligandu radionuklid. Každá metóda alebo technika má svoju nevýhodu a výnimkou nieje ani technika real-time radioimunoanalýzy. Hlavnou nevýhodou pri meraní interakcie je možné odparenie bunkovej kultúry behom behu. Ďalšia potenciálna nevýhoda môže byť komplikované naočkovanie buniek v bunkovej miske predovšetkým horšie adherujúcich bunkových kultúr. [12]

V rámci experimentov urobených v tejto práci bola bunková linia SKOV3 nasadená v malom výseku do Petriho misky v množstve jeden milión buniek. V protiľahlej oblasti sa bunky nenachádzali z dôvodu merania prípadnej nešpecifickej väzby. Bunky boli opláchnuté pred analýzou jeden krát 5 ml roztoku PBS a následne sa pridali 3 ml Krebs-Ringerovho roztoku. Táto Petriho miska bola vložená do prístroja automatickej radioimunoanalýzy detekované v reálnom čase nazývaného ako LigandTracer Yellow (verzia pre meranie gama žiarenia), ktorý bol temperovaný v inkubátore s teplotou 37 °C. V špeciálnom ovládacom programe pre tento prístroj bolo nastavené meranie pre zobrazenie zbieraných dát v časových úsekoch 1 alebo 3 minút. Okrem toho bolo potrebné nastaviť typ radionuklidu, aby sa zaznamenávala energia jeho radioaktívneho žiarenia, aby sa mohol zahrnúť fyzikálny poločas rozpadu tohto radionuklidu do korekcie meraného signálu. Najprv meranie prebiehalo bez pridania radioligandu čo trvalo 10 minút, tým sa stanovilo pozadie signálu bez žiarenia.

Následne sa až pridal pipetou ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab (3nM) pričom meranie prebiehalo ďalšie cca 2 hodiny pri teplote 37°C dovtedy, pokiaľ došlo k viditeľnej ekvivalencií (rovnováhe) medzi voľnou a na VEGFR-2 viazanou frakciou značenej protilátky, čo sa prejavilo ako narovnanie krivky. Po ustálení rovnováhy medzi naviazaným a nenaviazaným ramucirumabom sa pridal ďalší podiel značenej protilátky, aby jeho

výsledná koncentrácia v Krebs-Ringerovom roztoku bola 9 nM v Petriho miske. Po dosiahnutí druhého rovnovážného stavu pre koncentráciu 9 nM bolo medium odsaté a namiesto neho sa pridali 3 ml čerstvého Krebs-Ringerovho roztoku bez obsahu radioaktívne značenej protilátky. Meranie ďalej pokračovalo po dobu 1-2 hodín, kedy sa merala disociácia, tj. síla väzby ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na receptory VEGFR-2, kedy neprítomnosť voľného značeného ramucirumabu pôsobí prípadnou disociáciou komplexu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab – VEGFR-2 s ohľadom práve na väzbovú silu tohoto komplexu. Po dokončení merania sa bunky zničili chemickým prípravkom Savo.

Výsledná kinetika väzby radiofarmaka na VEGFR-2 bola vyhodnotená v programe TraceDrawer, pomocou ktorého sa stanovila hodnota rovnovážnej disociačnej konštanty K_D , teda miera afinity radioaktívne značenej protilátky k cieľovému receptoru.

4.5.10 Saturačná štúdia ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pomocou ručnej metódy

Ručná technika stanovenia väzby radiokonjugátu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab bola vykonaná na 24-jamkovej doštičke, kedy sa k bunkám v každej jamke pridával Krebs-Ringerov roztok s radioaktívne značenou protilátkou. Najprv bolo odsaté kultivačné médium z každej jamky a bunky boli jedenkrát opláchnute roztokom PBS (1 ml). Následovalo pridanie Krebs-Ringerovho roztoku (0,5 ml) do každej jamky s odpovedajúcou koncentraciou rádioligandu. Bolo použitých šesť zvyšujúcich sa koncentrácií radiofarmaka (1, 3, 9, 15, 30 a 45 nM). Pre každú koncentráciu sa použil triplikát jamiek a bunky boli následne inkubované pri 37°C po dobu 1 hodiny v nesterilnom bunkovom inkubátore v rámci stanovenia špecifickej väzby. Rovnako tak sa postupovalo aj v prípade stanovenia nešpecifickej väzby s tým rozdielom, že sa do každej jamky s bunkami vedľa radioaktívne značeného ramucirumabu pripídal aj nativný, neznačený ramucirumab (1 μM).

Po ukončení inkubácie sa odsál Krebs-Ringerov roztok, bunky sa dvakrát opláchli roztokom PBS (1 ml) a následne sa pripipetoval desintegračný roztok TritonX (0,5 ml). Bunky se nechali po dobu 20 až 30 minút desintegrovať pri 37°C. Nakoniec sa z každej jamky odpipetovalo 20 μl lyzátu buniek do 96-jamkovej doštičky, urobené v duplikáte pre každú jamku s bunkami, pre stanovenie množstva bunkového proteínu (popis viz nižšie), a zbytok lyzátu sa previedol do centrifugačných skúmaviek, ktoré sa následne zmerali na prítomnú rádioaktivitu v prístroji Gamma counter.

Stanovenie bunkového proteínu bolo vykonané pomocou roztoku bicinchonovej kyseliny (BCA). Na receptory viazaná alebo do buniek internalizovaná radioaktivita sa

prepočítavala na množstvo bunkového proteínu. Z každej jamky 24-jamkovej doštičky sa odpipetovalo 20 μ l vzorku v duplikáte do 96-jamkovej doštičky. Následne sa pripravila kalibračná rada za použitia bovinného sérového albuminu (BSA) ako štandardu. Kalibračná rada BSA bola pripravená v koncentraciách 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 μ g/ml. Pre každú koncentraciu štandardu sa pripravil duplikát jamiek v 96 jamkovej doštičke, kedy sa do každej jamky pipetovalo 20 μ l štandardu. Ku každej koncentrácii štandardu alebo vzorku bolo pridané 200 μ l roztoku BCA, ktorý s proteínami vytvára komplex s rozdielnou intenzitou sfarbenia v závislosti na koncentrácii proteínu. Na základe intenzity sfarbenia je meraná absorbanca na spektrofotometre Tecan pri vlnovej dĺžke $\lambda = 590$ nm. V programe MS Office Excel bola zostrojena kalibračná priamka pre kalibračnú radu s rovnicou lineárnej regresie, podľa ktorej boli urobené jednotlivé výpočty koncentrácie bunkového proteínu vo vzorkách a na získané koncentrácie bola prepočítaná na receptory viazaná a do buniek internalizovaná radioaktivita meraná na prístroji Gamma counter. Exponenciálna závislosť na receptory väzanej a do buniek internalizovanej radioaktivity na príslušnej koncentrácii ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab bola vynesená v programe Graph-Pad Prism 7.0. Z tejto závislosti bola programom spočítaná hodnota rovnovážnej disociačnej konštanty K_D .

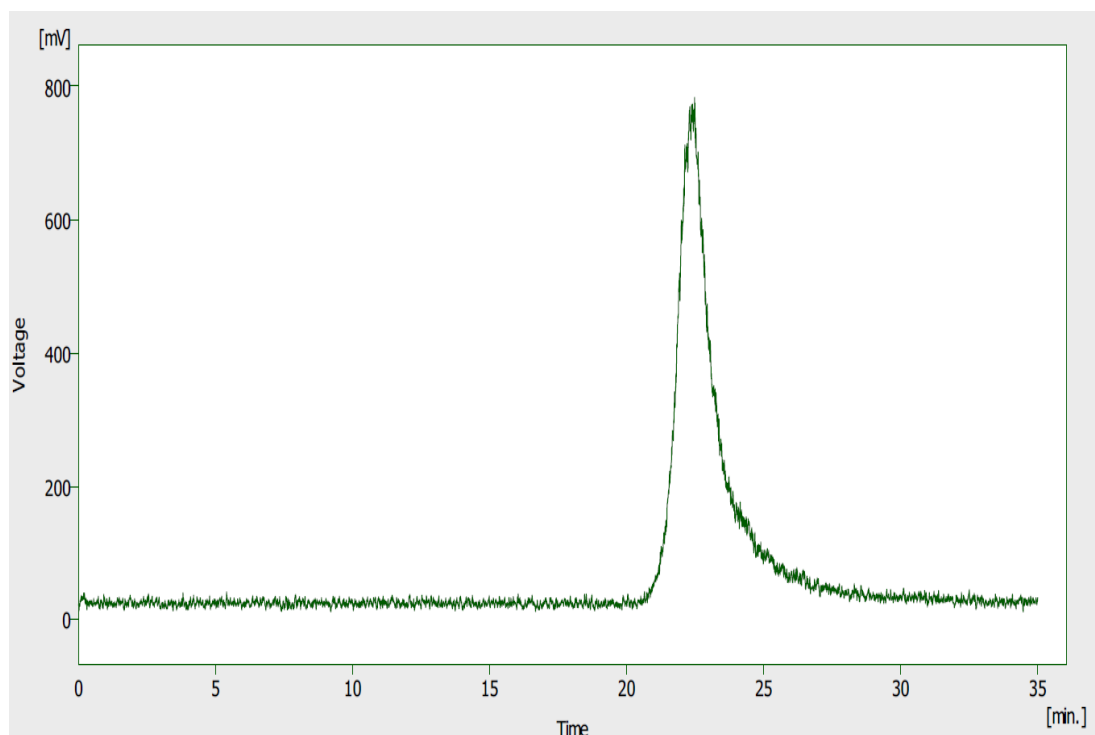
5 Výsledky

V tejto kapitole sú uvedené výsledky experimentálnych meraní. Na začiatku kapitoly sú uvedené výsledky metód pre zistenie radiochemickej čistoty pripraveného radiofarmaka ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu za použitia metód HPLC a iTLC a ďalej sa nachádzajú výsledky saturačnej štúdie značenej protilátky s cieľovými receptorovými štruktúrami exprimovaných na povrchu SKOV3 buniek.

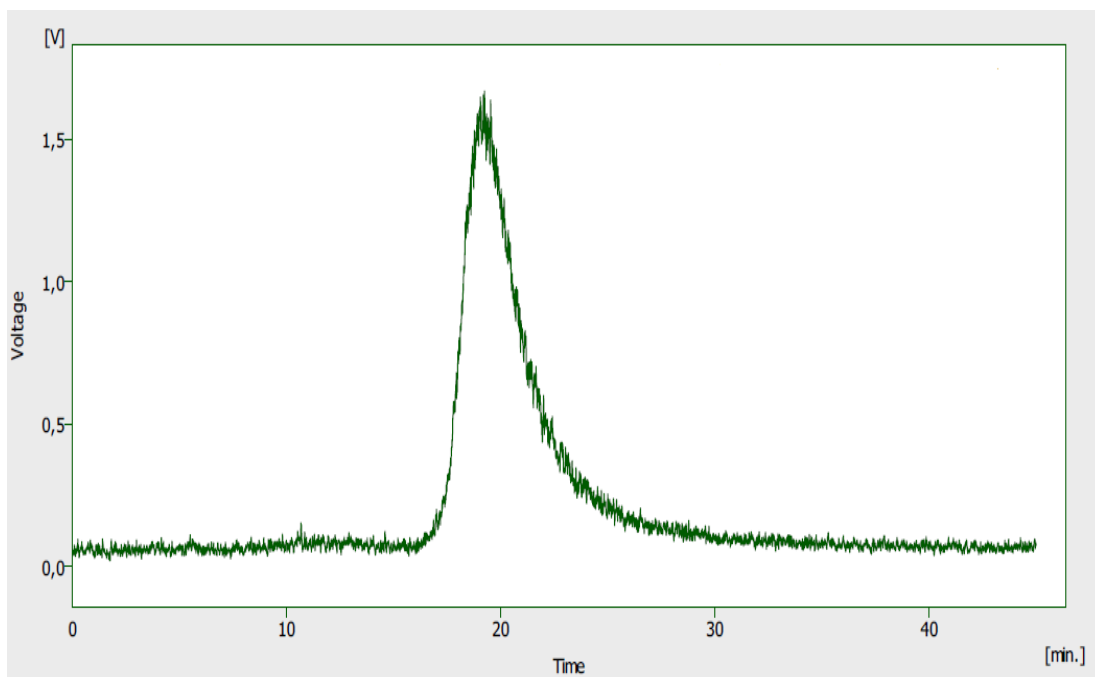
5.1 Stanovenie radiochemickej čistoty HPLC metódou

V tejto kapitole sú uvedené tri grafy, pričom prvý z nich znázorňuje voľný rádionuklid ^{99m}Tc (**Obrázok 11**), ktorý eluuje v zhruba 23. minute. Ďalšie dva chromatogramy znázorňujú stav komplexu ^{99m}Tc –HYNIC- RAM v čase 0 hod (**Obrázok 12**) a 24 hod (**Obrázok 13**) po značení, kedy radiofarmakum eluuje v čase 20. minúty.

Podľa výsledku merania sa dá vidieť, že pripravené radiofarmakum bolo čisté, bez prítomnosti radionečistot, hlavne voľného technécia. Pripravený radioaktívny komplex protilátky, ktorý bol inkubovaný v roztoku PBS pri teplote 4°C , bol stabilný aj po 24 hodinách od doby značenia, čož potvrdzuje **Obrázok 13**, aj keď je tu silný šum z dôvodu krátkého fyzikálneho poločasu radionuklidu technécia ($T_{1/2} = 6$ hod).

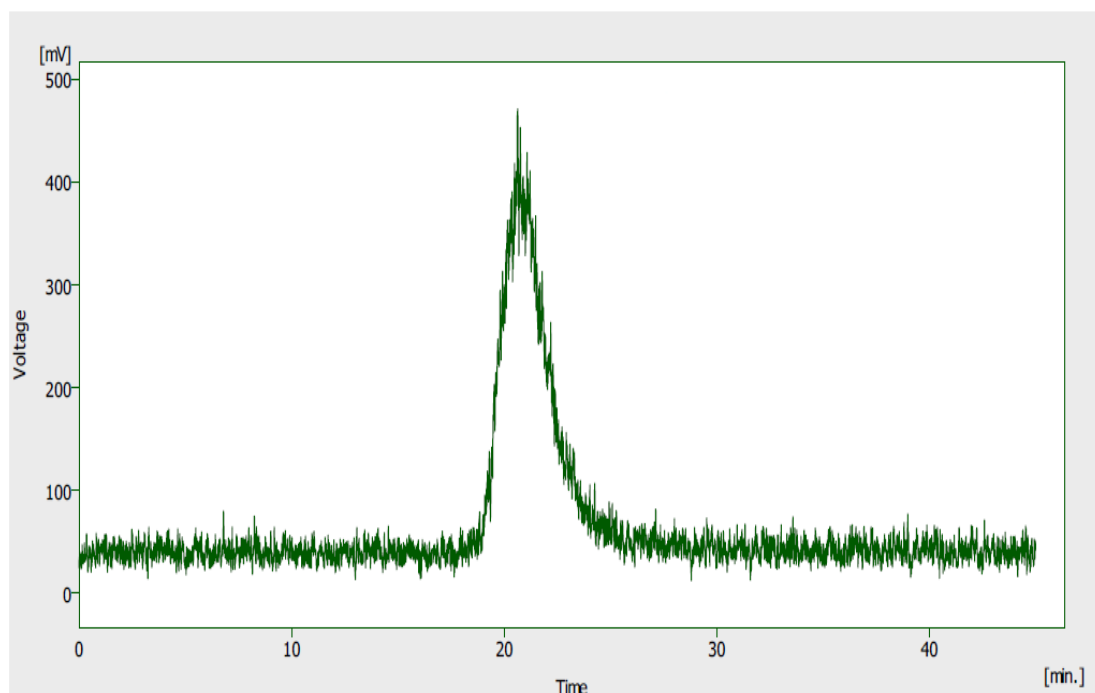


Obrázok 11: Radiochromatogram voľného rádionuklidu ^{99m}Tc (TcO_4^-).



Obrazok 12: Radiochromatografický záznam HPLC merania

*^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab získaný ihneď po radioaktívnom značení a prečistení.
V zázname nebol pozorovaný pik značiací prítomnosť merateľnej radiochemickej nečistoty.*



Obrazok 13:- Radiochromatografický záznam HPLC merania

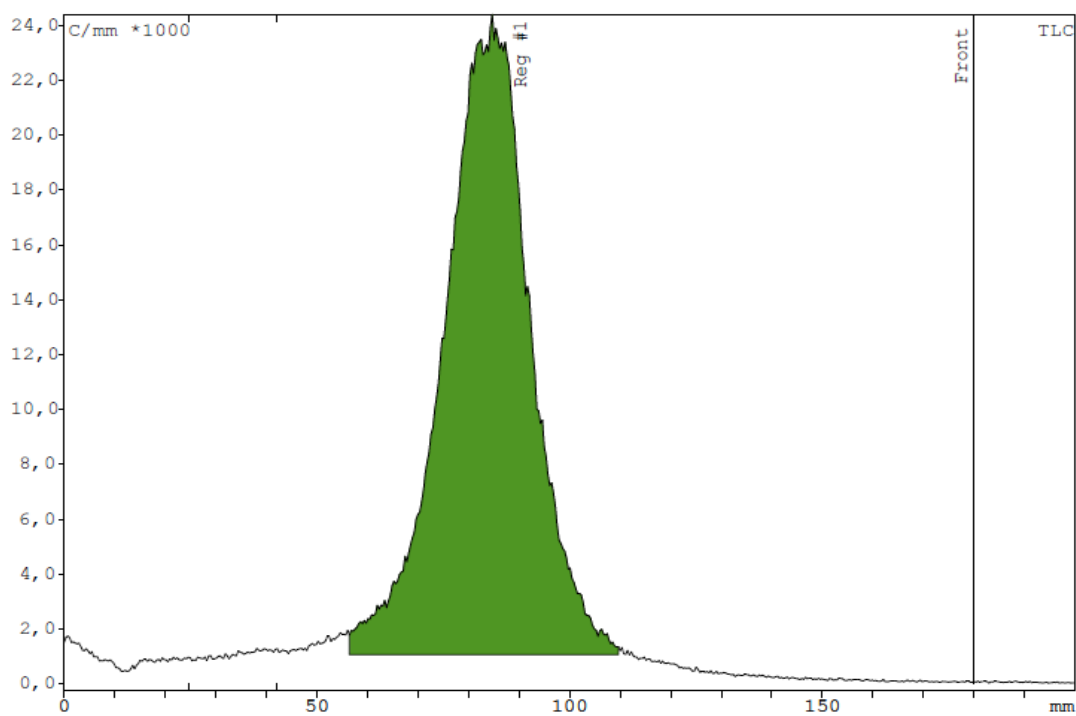
^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab po 24 hodinách od radioaktívneho značenia. Aj s odstupom času od doby značenia nebola zistená prítomnosť voľného technécia. Rádiofarmakum sa po tejto dobe javilo ako stabilné.

5.2 Zisťovanie čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab metódou iTLC

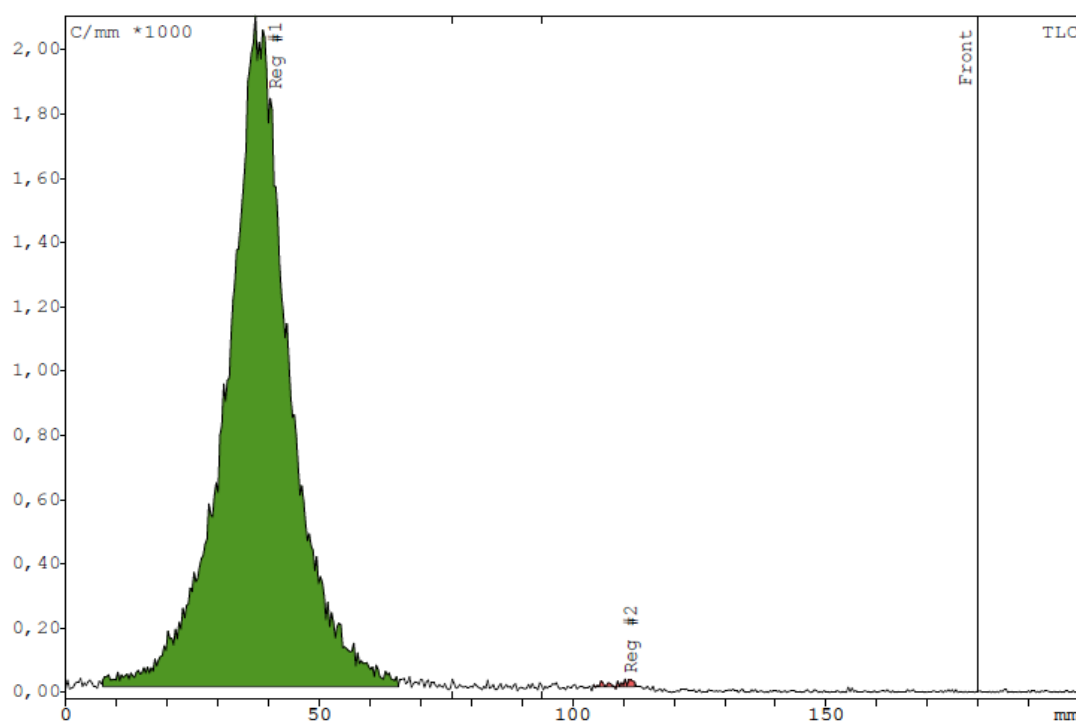
Ako druhá metóda k overeniu radiochemickej čistoty radioligandov bola použitá iTLC. Oproti HPLC metóde je iTLC metóda menej citlivá a slúži skôr na orientačné stanovenie čistoty pripravených radioligandov. Rovnako ako u HPLC bola vykonaná analýza voľného radioaktívneho technécia (**Obrázok 14**). Zo získaných výsledkov môžeme vyhodnotiť, že táto metóda potvrdila zanedbateľnú prítomnosť nečistôt pri inkubácii 0 hod a 24 hod (**Obrázok 15 a 16**) od prevedenia radioaktívneho značenia. Pre porovnanie je na **Obrázku 17** znázornený chromatogram nepodareného značenia, kedy sa pripravené radiofarmakum nepoužilo pre ďalšiu *in vitro* experimentálnu prácu. Percentuálne množstvo nečistôt pro iTLC záznamy uvedené v **Obrázku 15 a 16** je uvedené v **Tabuľke 4**.

Tabuľka 4: Percentuálne vyjadrené hodnoty radiochemickej čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab (zelené vyjadrené hodnoty) a percentuálny obsah radiochemickej nečistoty ^{99m}Tc (červene vyjadrené hodnoty) zmerané v 0. a 24. hodine od značenia podľa záznamu v **Obrázku 15 a 16**.

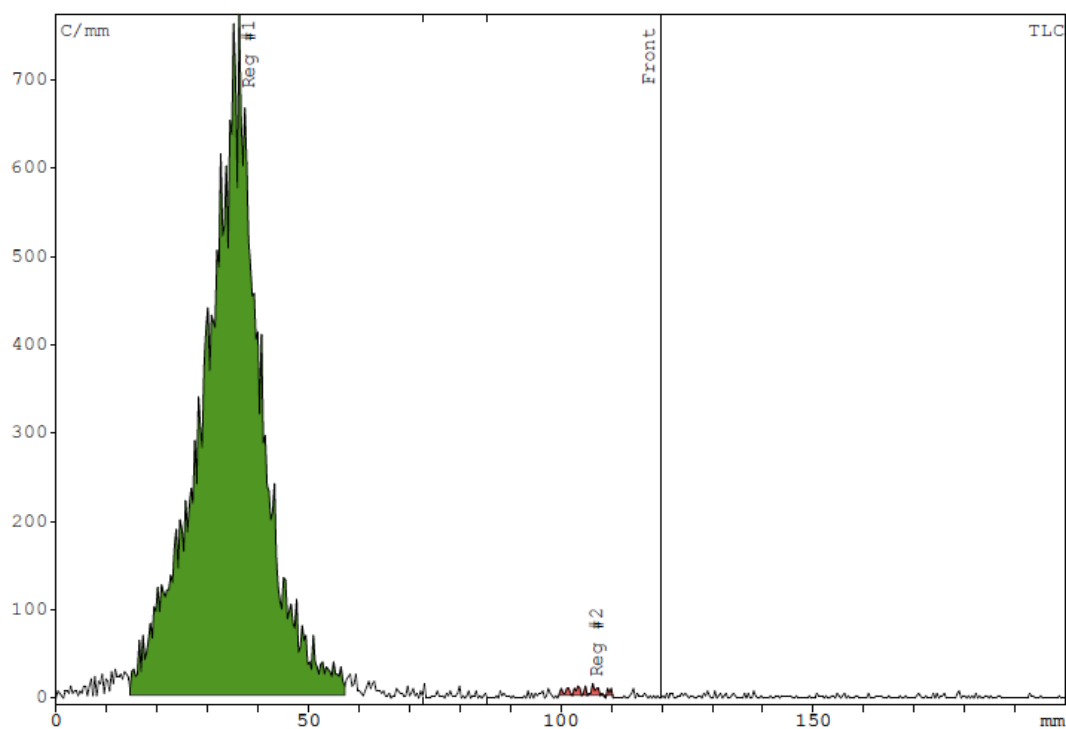
| Obrázok 15 0 hodín | Obrázok 16 24 hodín |
|-----------------------|------------------------|
| 99,78 % | 99,55 % |
| 0,22 % | 0,45 % |



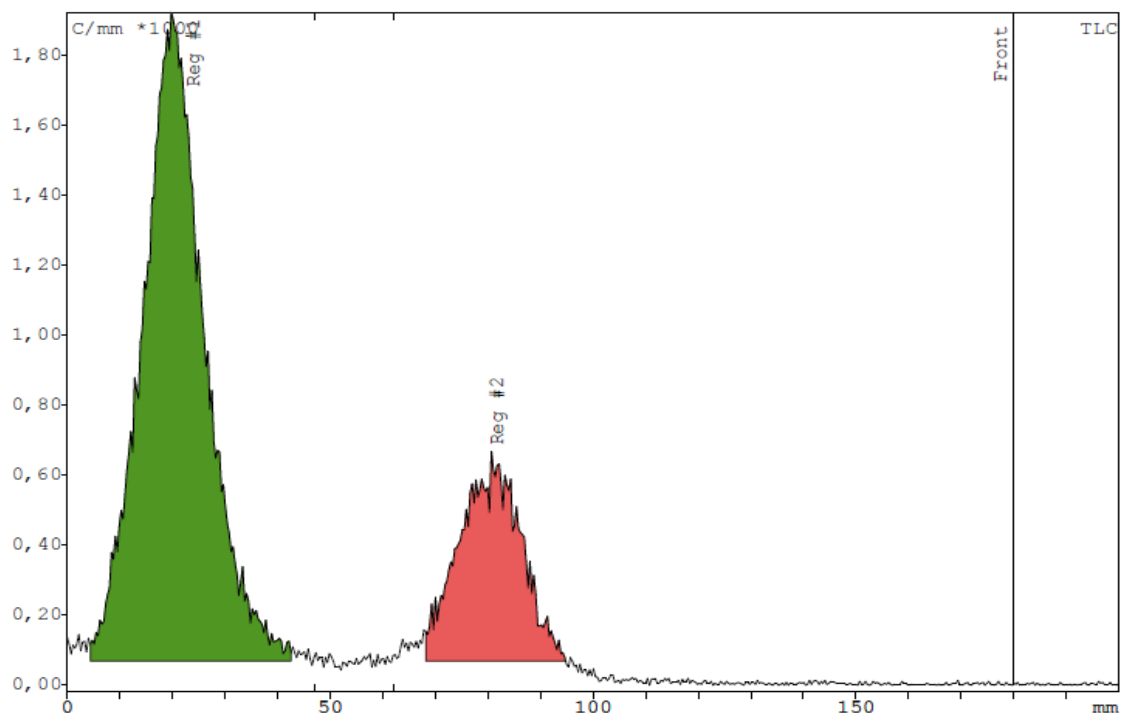
Obrazok 14: iTLC chromatogram voľného radioaktívneho technécia



Obrazok 15: Výsledný iTLC chromatogram merania čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu v 0 hodine od radioaktívneho značenia.



Obrazok 16: Výsledný iTLC chromatogram merania čistoty ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu v 24. hodine od radioaktívneho značenia.



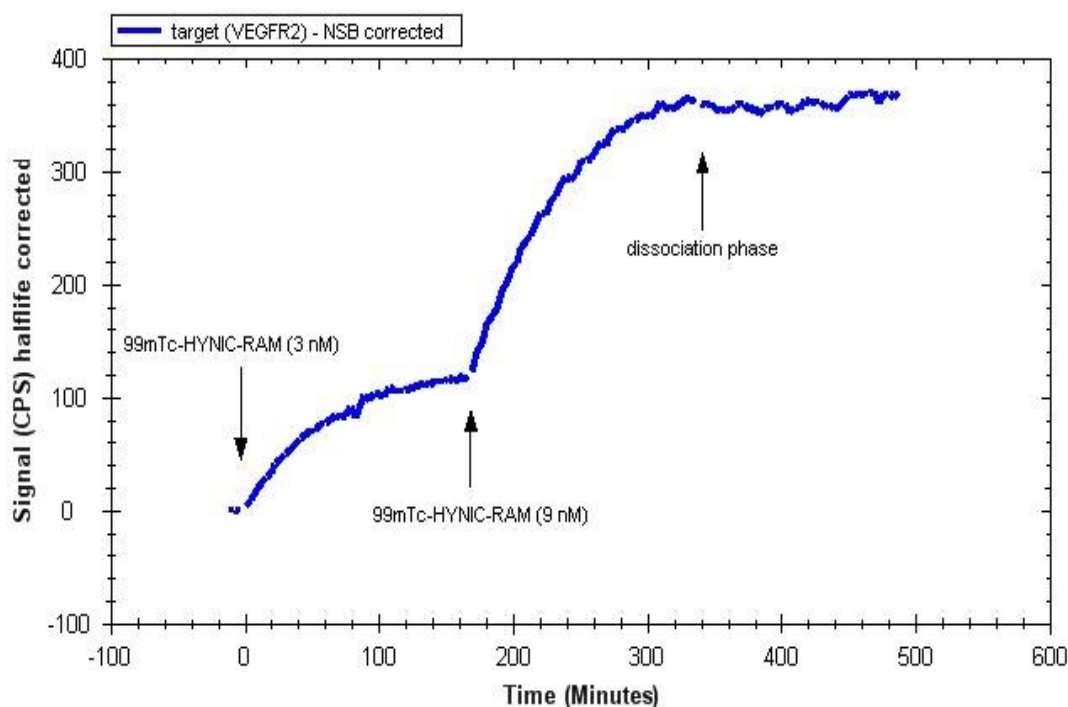
Obrazok 17: iTLC záznam znázorňujúci nepodarené radioaktívne značenie HYNIC-ramucirumabu, kedy je tu viditeľná prítomnosť nenaviazaného technécia (ružový pík).

5.3 Meranie väzby rádioligandu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na VEGFR-2 pomocou radioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase

V tejto kapitole je uvedený príklad záznamu kinetickej interakcie pripraveného radiofarmaka ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab s VEGFR-2 (**Obrázok 18**) na povrchu buniek SKOV3 získaného z merania na prístroji LigandTracer Yellow. Súčasťou merania bolo následné vyhodnotenie jednotlivých záznamov v programe TraceDrawer, v ktorých sa z tvaru a priebehu krivky stanovila rovnovážná disociačná konštanta určujúca afinitu značenej protilátky k cieľovému receptoru. Výsledné hodnoty K_D pre tri nezávisle merania sú zhrnuté v **Tabuľke 5**. Z výsledných hodnôt bola spočítaná priemerná hodnota $K_D = 3,52 \pm 1,00$ nM.

Tabuľka 5: Hodnoty K_d pre ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab získane za použitia automatickej metódy.

| Dátum merania | K_D (nM) |
|---------------|------------|
| 1.11.2016 | 4,12 |
| 29.11.2016 | 4,33 |
| 16.2.2017 | 2,12 |



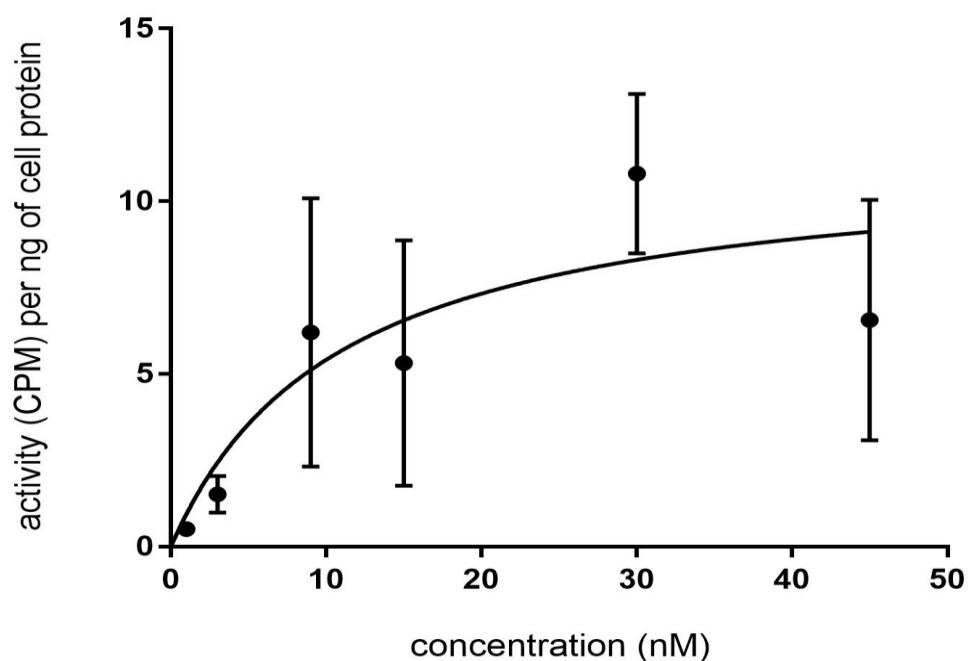
Obrázok 18: Značený ligand ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab bol pridávaný v dvoch koncentračných prídavkoch. Prvá koncentrácia bola 3 nM a následujúca druhá bola 9 nM. Obe prídavky ligandu boli súčasťou asociačnej fázy ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu kinetické interakcie s VEGFR-2. Meranie sa pre každú koncentráciu nechalo bežať do doby, pokiaľ vznikla vzájomná rovnováha medzi na receptory viazanou formou a formou voľne prítomnou v médiu. Po asociačnej fáze nastúpila fáza disociačná, ktorá umožňuje stanoviť silu väzby medzi radioligandom a cieľovou štruktúrou. Disociačná fáza bola meraná bez prítomnosti voľného radioligandu v médiu.

5.4 Saturačné štúdie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab pomocou ručnej metódy

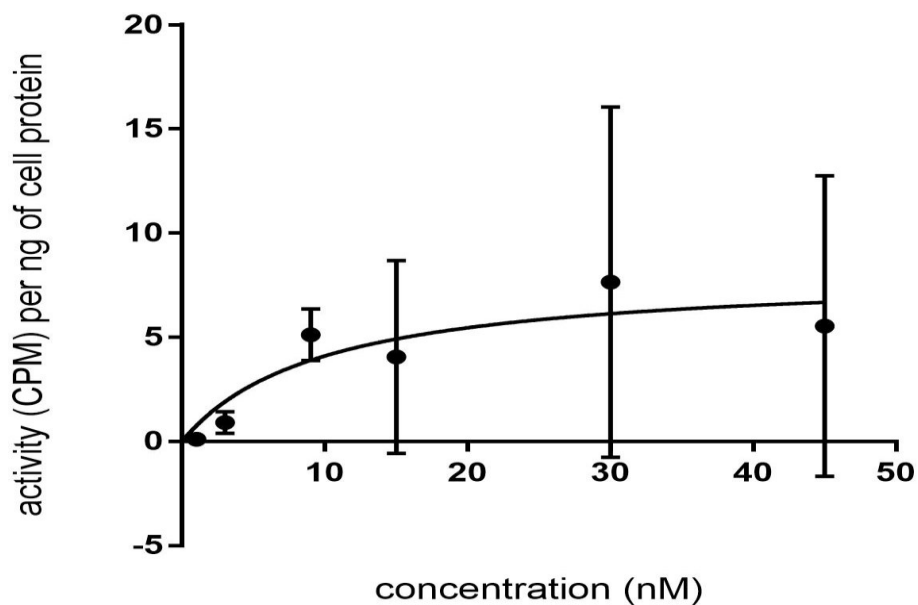
V tejto kapitole sú uvedené výsledné hodnoty merania rovnovážnej disociačnej konštanty pre tri nezávislé experimenty. Hodnoty K_D boli získané na základe výsledkov merania v rámci následného vyhodnotenia dát v programe GraphPad Prism a sú zhrnuté v **Tabuľke 6**. Tiež sú tu uvedené príklady grafického zobrazenia merania závislosti bunkovo viazanej aktivity prepočítané na množstvo bunkového proteínu na koncentráciu testovaného ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumabu. Tieto jednotlivé merania sú uvedené na **Obrázku 19, 20 a 21**. Priemerná hodnota K_D z troch nezávislých meraní bola spočítaná na $11,23 \pm 1,60$ nM.

Tabuľka 6: Hodnoty K_D radioligandu ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab merané na bunkovej línii SKOV3 pomocou manuálnej metódy.

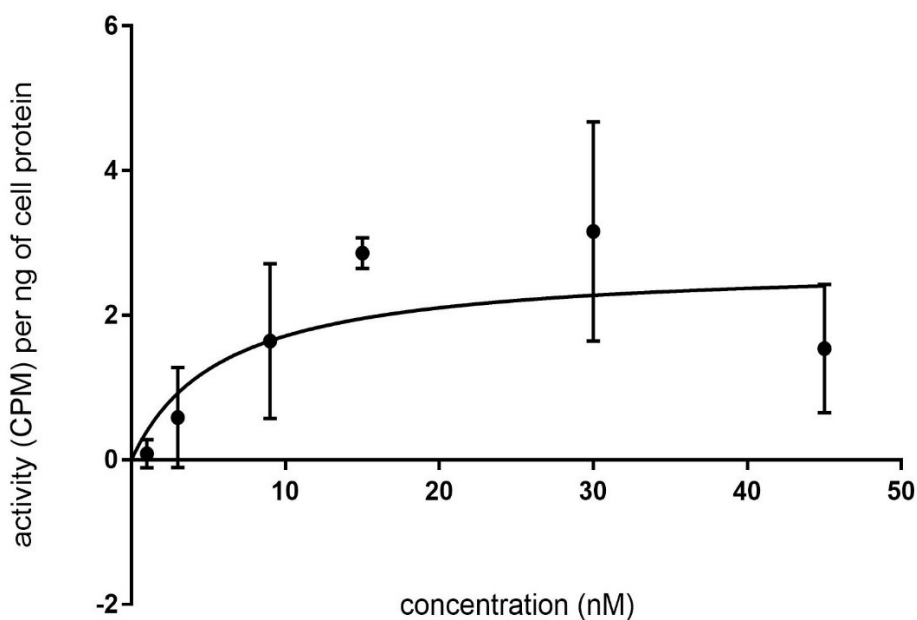
| Dátum merania | K_D (nM) |
|---------------|------------|
| 1.11.2016 | 10,95 |
| 29.11.2016 | 9,79 |
| 16.2.2017 | 12,96 |



Obrázok 19: Grafický záznam merania interakcie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na VEGFR-2 exprimovaného na povrchu SKOV3 buniek z dňa 1.11.2016. S rástucou koncentráciou radioligandu (os x) sa zvyšovala bunkovo viazaná aktivita značeného proteínu. Stanovené K_D odpovedá hodnote 10,95 nM.



Obrázok 20: Grafický záznam merania interakcie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na VEGFR-2 exprimovaného na povrchu SKOV3 buniek z dňa 29.11.2016. S rástucou koncentráciou rádioligandu (os x) sa zvyšovala bunkovo viazaná aktivita značeného proteínu. Stanovené K_D odpovedá hodnote 9,79 nM.



Obrázok 21: Grafický záznam merania interakcie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab na VEGFR-2 exprimovaného na povrchu SKOV3 buniek z dňa 16.2.2017. S rástucou koncentráciou rádioligandu (os x) sa zvyšovala bunkovo viazaná aktivita značeného proteínu. Stanovené K_D odpovedá hodnote 12,96 nM.

6 Diskusia

V poslednej dobe začali monoklonálne protilátky nachádzať čo raz väčšie uplatnenie v liečbe predovšetkým u pacientov s nádorovým ochorením. Fungujú spôsobom, že sa špecifický naviažu na bunky, ktoré sú nádorovo transformované, proliferujúce a ktoré sa bežne v organizme nenachádzajú, alebo sa nachádzajú v nie tak veľkom množstve ako u nádorových tkanív. Všetky tieto bunky sú charakteristické tým, že majú na svojom povrchu nádorovo špecifické proteínové štruktúry, na ktoré sú pripravené monoklonálne protilátky cielené. [32]

Súčasná chemoterapie používané na liečbu pacientov s nádorom vaječníkov zahŕňajú doxorubicín, topotekán a paklitaxel. Inhibícia angiogenézy sa považuje za sľubný prístup k liečbe nádorového ochorenia. Vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF) je dôležitým regulátorom angiogenézy a je pravdepodobne dôležitým terapeutickým cieľom pri pretrvávajúcom alebo rekurentnom epiteliálnom ovariálnom karcinóme. VEGF je nadmerne exprimovaný vo vaječníkovom tkanive a môže byť najdôležitejším jediným nádorovým angiogénnym faktorom. [31]

Jednou z monoklonálnych protilátok, ktorá sa pomaly uplatňuje v boji s niektorými typmi nádorov, je ramucirumab. Táto monoklonálna protilátka bola testovaná a skumaná mnohými štúdiami, ktoré testovali ako účinok samotného ramucirumabu, tak aj jeho kombináciu s inými látkami. Zároveň sa testoval na rôzne typy nádorov. Nemecka štúdia zistila výhodnú účinnosť ramucirumabu pri jeho kombinácii s paklitaxelom. Vďaka tejto štúdií bol ramucirumab regulačne schvalený na liečbu pacientov trpiacich pokročilým, metastatickým nádorom žalúdka po tom, čo absolvovali chemoterapiu s fluorpyrimidínom alebo platinou. [32]

Pred niekoľkými rokmi vznikla myšlienka, ako by sa dalo zlepšiť uplatnenie niektorých monoklonálnych protilátok pri väzbe na nádorovo špecifické receptory. Začali sa skúmať radioaktívne prvky ako diagnostický alebo terapeutický agenti pre vizualizáciu alebo terapiu nádorových ochorení. Medzi skupinu radiodiagnostických nuklidov sa radí aj veľmi obľúbený prvok nukleárnej medicíny ^{99m}Tc . Začalo sa vyvíjať viac prístupov k naviazaniu tohoto radioligandu na monoklonálne protilátky. Jedným z nich bolo priame značenie a druhým bolo nepriame značenie pomocou nejakého chelatačného činidla. Najpoužívanjšie takéto činidlo je chelátor HYNIC. Toto činidlo sa viaže na biomelukulú prostredníctvom amidovej väzby. Táto kombinácia činidla HYNIC spolu s radioligandom ^{99m}Tc a ramucirumabu bola použitá aj v tejto predkladanej diplomovej práci. [13]

Hlavným dôvodom prečo vznikajú a využívajú sa radiofarmaka je tzv. cieľná distribúcia. Dnešné radiodiagnostické metódy síce poskytujú požadované výsledky, ale pri radiodiagnostike sa používajú látky, ktoré môžu reagovať okrem nádorových buniek aj so zdravým okolitým tkanivom, čo so sebou prináša nežiaduce účinky. Tie môžu byť častokrát dôvodom prečo pacient odmietne pokračovať v liečbe. Preto je vízia cieľnej distribúcie radiokativne značeného ligandu veľmi významná. Tým, že pacient nebude vystavovaný nežiaducím účinkom v takom množstve, by sa podporila aj compliance pacienta.

Pred tým ako sa samotný pripravený radioimunokonjugát ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab aplikoval na bunky sme zisťovali aj jeho radiochemickú čistotu, aby sme sa utvrdili v tom, že ho môžeme použiť pre *in vitro* saturačné štúdie. Na zisťovanie čistoty sme použili vyššie popisované metódy iTLC a HPLC s radiometrickou detekciou. Zaujímalo nás teda či sa okrem značenej protilátky v roztoku vzorku nenachádza prípadná rádionečistota ako voľné technécium. Meranie bolo uskutočnené okamžite po radioaktívnom značení HYNIC-ramucirumab radionuklidom ^{99m}Tc a potom po 24 hodinách od doby značenia, aby sa zistilo prípadné uvoľnenie ^{99m}Tc z komplexu. Výsledky boli takmer vždy pozitívne s hodnotami radiochemickej čistoty nad 99 %. V jednom prípade nam ale značenie nevyšlo a čistota dosahovala iba 76 %, čo znamená že 23 % boli nečistoty tvorené nenaviazaným technéciom. Dôvodom ale mohla byť nízka koncentrácia pridaných cínnych jontov, či chybné prevedené značenie. Vzorky ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab, ktoré boli použité pre *in vitro* štúdie, tak vždy splňovali podmienky použitia radiofarmaka podľa Európskeho liekopisu pre podanie pacientom, teda hodnôt minimálnej radiochemickej čistoty 95 %.

Pri *in vitro* saturačnej štúdií boli použité bunky SKOV3 ovarialného adenokarcinómu. V štúdiách saturačnej väzby sa meria a analyzuje množstvo radioaktívneho ligandu potrebného pre saturovanie receptorov, aby sa určila rovnovážna disociačná konštanta (K_D), čo je užitočný merač afinity radioligandu viažuceho sa na cieľovú bunkovú štruktúru. Ako hlavné overovacie saturačné štúdie boli použité metódy automatickej radioimunoanalýzy za pomoci prístroja LigandTracer a ďalej manuálna saturačná technika. Obe metódy poskytli hodnoty K_D u radioaktívne poznačenej protilátky. Hodnoty K_D získané metódou LigandTracer sme tiež porovnávali so zavedenou manuálnou technikou, ktorá je často používaná pri mnohých *in vitro* štúdiách a je označovaná za “zlatý štandard”. Pri oboch metódach bolo stanovenie parametru vykonané trikrát.

Pokiaľ zhodnotíme graf merania interakcie medzi ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab a VEGFR-2 na povrchu buniek pomocou automatickej radioimunoanalýzy s detekciou

v reálnom čase, vidíme pomerne hladký priebeh väzby radioligandu na bunkový receptor. Krivka stúpa síce pozvoľne a dosiahnutie bodu ekvivalencie, kedy je vytvorený rovnovážný pomer medzi viazanou a neviazanou frakciou radiofarmaka v médiu s bunkami, je docielený po cca dvoch hodinách inkubácie. Pozvoľný nárast, charakterizovaný „mierne položeným“ tvarom krivky, viazané frakcie radiofarmaka na bunkové receptory a doba trvania dosiahnutia bodu ekvivalencie poukazujú na relatívnu pomalosť interakcie protilátka – receptor. Strmší tvar krivky by určoval dynamickejšiu interakciu protilátky na cieľovom receptore a teda vyššiu afinitu.[10] Níčmenej, väzba radioaktívne značenej protilátky na receptor bola veľmi silná, čo dokláda len skutočne nepatrný pokles krivky behom disociačnej fázy, teda fázy, kedy sa bunky inkubovali po prebehnutnej asociačnej fáze v médiu bez prítomnosti voľného radioaktívne značeného ramucirumabu.

Pokiaľ sa pozrieme na tvar kriviek interakcie ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab s VEGFR-2 meraných pomocou manuálnej saturačnej techniky, vidíme taktiež relatívne pozvoľný nárast krivky so zvyšujúcou sa koncentráciou radioligandu pridávaného k bunkám. Navyše je tu viditeľný jav, kedy ani pri koncentrácií 45 nM nedošlo k úplnému nasyceniu receptorov pripravenou radioaktívne značenou protilátkou, čo býva jedna z nevýhod end-pointových analýz, ako je manuálna saturačná technika. Neúplná saturácia tak môže negatívne zkresliť výsledok pri konečnom vyhodnotení nameraných dát.

V minulosti bola vykonaná štúdia účinku protilátky ramucirumab na ovarialny karcinóm prostredníctvom pôsobenia na VEGFR-2. Výsledkom tejto štúdie bolo, že nativná monoklonálna protilátka ramucirumab sa viaže s vysokou afinitou k extracelulárnemu VEGFR-2, kedy jej rovnovážná disociačná konštanta bola určená na približne 50 pM. Narozdiel od iných pripravených látok namierených proti VEGFR-2, ramucirumab viaže špecifický epitop na extracelulárnu doménu VEGFR-2, čím blokuje všetky ligandy VEGF z väzby na tento terapeuticky validovaný cieľ. Aj keď množstvo inhibítorov tyrozín kináz je používaných, ich biochemická promiskuita a potenciál pre mimoriadnu toxicitu predstavujú potenciálne obmedzenia v liečbe rakoviny. Vzhľadom na to, že ramucirumab sa viaže na VEGFR-2 špecificky a s vysokou afinitou, ponúka racionálnu modulačnú výhodu. [31]

Afinita zistená zo štúdie odpovedá 0,05 nM, ale v našej práci vyšli hodnoty o čosi vyššie. Pri automatickej metóde bola priemerná hodnota $K_D = 3,52 \pm 1,00$ nM a pri manuálnej metóde bola $K_D = 11,23 \pm 1,60$ nM. Platí, že čím je disociačná rovnovážna konštanta nižšia, tým je pevnejšia väzba na receptor a teda aj afinita imunokomplexu k nemu. V štúdií bol však použitý čistý ramucirumab, ktorý sa viazal na izolované receptory. [32.] Kdežto v našej

štúdií sa radioaktívne značený ramucirumab viazal na bunkový receptor, kedy pomery na bunkovom povrchu ako hustota receptorov, vplyv okolitých receptorov a ďalších proteinových štruktúr, môže negatívne ovplyvňovať mieru väzby ligandu na jeho cieľ. Napriek tomu vychádza celkom stále vysoká afinita nášho komplexu na receptor.

Rozdiel v hodnotách K_D získaných meraním pomocou manuálnej a automatickej metódy mohol byť spôsobený vlastnou prácou, a to hlavne u manuálnej sauračnej štúdie, a ďalej možným vplyvom behom vyhodnotenia dát u oboch metód. Navyše, u manuálnej techniky sa vždy prejaví vplyv nedokonalého prevedenia teda konkrétne nasýtenia bunkových receptorov na tvar krivky a teda potom aj na výslednú kalkuláciu hodnôt rovnovážnej disociačnej konštanty.

Monoklonálna protilátka ramucirumab radioaktívne značená nuklidom ^{99m}Tc by teda vzhľadom na svoju afinitu mohla byť používaná na zobrazovanie napríklad ovariálneho karcinómu, ale otázkou zostáva jej *in vivo* chovanie, ktoré je potrebné otestovať.

7 Záver

- Cieľom práce bolo v prvom rade sa zoznámiť a následne rutinne vykonať bunkovú kultiváciu a ďalej získať skúsenosť s experimentálnou prácou zahrňujúcu manipuláciu s radioaktívnym žiaričom a tým aj získať skúsenosť z práce v radionuklidovom laboratóriu, kde je potrebné dodržiavať špeciálne podmienky práce definované Atomovým zákonom ČR.
- Rutinná bunková kultivácia nádorovej línie SKOV3 bola vykonaná úspešne. Bunky boli pripravované pre vlastné *in vitro* experimenty, kedy boli nasadené do 24-jamkovej doštičky v množstve 1×10^5 buniek na jamku a vpočte 1×10^6 na Petriho misky, kedy bunková línia bola nasadená na povrch Petriho misky v malom výseku.
- Značenie monoklonálnej protilátky ramucirumab bolo úspešne urobené nepriamou cestou cez cheletačné činidlo HYNIC. Po predchádzajúcej úspešnej konjugácii molekuly HYNIC na protilátku, bol vzniknutý konjugát HYNIC-ramucirumab značený rádioaktívnym ^{99m}Tc . U pripraveného radiofarmaka ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab bola stanovená radiochemická čistota pomocou metód iTLC a HPLC s radiometrickou detekciou s výsledkom okolo 99%.
- Pripravené radiofarmakum ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab bolo ďalej testované na schopnosť sa viazať na bunkový receptor VEGFR-2 exprimovanom na bunkách ľudského ovariálneho karcinómu v rámci *in vitro* experimentov. *In vitro* stanovenie afinity radioaktívne značenej protilátky prebiehalo pomocou automatickej radioimunoanalýzy s detekciou v reálnom čase reprezentovanou prístrojom LigandTracer Yellow a ďalej pomocou ručnej metódy pre saturačné štúdie.
- Výsledky namerané prístrojom LigandTracer Yellow sa hodnotili v programe TraceDrawer a výsledky získané pomocou manuálnej techniky sa vyhodnotili ako závislosť bunkovo viazanej aktivity na pridávanej koncentrácii ^{99m}Tc -HYNIC-ramucirumab meranej na prístroji Gamma counter a následne vyhodnotené v programe GraphPad Prism.

- Koncentráciu bunkového proteínu sme stanovili meraním absorbancie na spektrofotometri na základe pripravenej kalibračnej rady albumínu metódou BCA pre stanovenie bunkového proteínu.
- Porovnanie výsledkov získaných na prístroji LigandTracer Yellow a výsledkov získaných manuálnou technikou na základe disociačných konštánt sa ukázalo, že sú tam mierne rozdiely v získaných hodnotách. Mierne odchyľka medzi hodnotami získanými manuálnou a automatickou metódou môže byť spôsobená rôznymi dôvodmi ako nepozornosť pri práci alebo chybným pipetovaním. Meraním sa však preukázala výhoda automatickej metódy pre saturačné štúdie hlavne z hľadiska menšieho rizika chýb, lepšej presnosti, citlivosti ale aj z hľadiska menšej časovej náročnosti.
- Na záver sa dá konštatovať, že nepriame značenie monoklonálnej protilátky ramucirumab cez chelatačné činidlo HYNIC radionuklidom ^{99m}Tc prebehlo úspešne, kedy si značená protilátka zachovala silnú afinitu k cieľovému angiogennému receptoru VEGFR-2. Vďaka použitému radionuklidu, ktorý je najčastejšie používaným radiodiagnostickým nuklidom v SPECT vyšetrení, by mohlo byť pripravené radiofarmakum sľubnou sondou pre radiodiagnostické vyšetrenie nádorových ochorení pozitívnych na VEGFR-2.

8 Zoznam literatúry

[1] HUANG, Xiaolin, Yijing LIU, Bryant YUNG, Yonghua XIONG a Xiaoyuan CHEN. Nanotechnology-Enhanced No-Wash Biosensors for in Vitro Diagnostics of Cancer. *ACS Nano* [online]. 2017, **11**(6), 5238-5292 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1021/acsnano.7b02618. ISSN 1936-0851.

[2] GONZALEZ DE CASTRO, D, P A CLARKE, B AL-LAZIKANI a P WORKMAN. Personalized Cancer Medicine: Molecular Diagnostics, Predictive biomarkers, and Drug Resistance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2012, **93**(3), 252-259 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1038/clpt.2012.237. ISSN 0009-9236.

[3] ZHANG, Jianming, Priscilla L. YANG a Nathanael S. GRAY. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2009, **9**(1), 28-39 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1038/nrc2559. ISSN 1474-175X.

[4] GIAMAS, Georgios, Yik L. MAN, Heidrun HIRNER, et al. Kinases as targets in the treatment of solid tumors. *Cellular Signalling* [online]. 2010, **22**(7), 984-1002 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.01.011. ISSN 08986568.

[5] AMALDI, Ugo. Nuclear physics applications in diagnostics and cancer therapy. *Nuclear Physics A* [online]. 2005, **751**, 409-428 [cit. 2018-01-22]. DOI: 10.1016/j.nuclphysa.2005.02.020. ISSN 03759474.

[6] FLATMAN, Stephen, Imtiaz ALAM, Jeffery GERARD a Nesredin MUSSA. Process analytics for purification of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **848**(1), 79-87 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.11.018. ISSN 15700232.

[7] BREEDVELD, FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet* [online]. 2000, **355**(9205), 735-740 [cit. 2017-11-09]. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)01034-5. ISSN 01406736.

[8] OTROCK, Zaher K., Jawad A. MAKAREM a Ali I. SHAMSEDDINE. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [online]. 2007, **38**(3), 258-268 [cit. 2017-12-14]. DOI: 10.1016/j.bcmd.2006.12.003. ISSN 10799796.

[9] ED. BY HELEN VAN VUNAKIS ... *Immunochemical techniques*. 2. [Dr.]. New York [u.a.]: Academ. Press, 1982. ISBN 0121819736.

[10] Bigott-Hennkens, H M; Dannoon, S; Lewis, M R; Jurisson, S S. The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging; Torino Vol. 52, Iss. 3, (Sep 2008): 245-53.

[11] TOKUNAGA, Yuko, Yasuo YAMAZAKI a Takashi MORITA. Specific distribution of VEGF-F in Viperinae snake venoms: Isolation and characterization of a VEGF-F from the venom of *Daboia russelli siamensis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2005, **439**(2), 241-247 [cit. 2018-03-06]. DOI: 10.1016/j.abb.2005.05.020. ISSN 00039861.

[12] BJÖRKE, Henrik a Karl ANDERSSON. Automated, high-resolution cellular retention and uptake studies in vitro. *Applied Radiation and Isotopes* [online]. 2006, **64**(8), 901-905 [cit. 2018-01-09]. DOI: 10.1016/j.apradiso.2006.03.002. ISSN 09698043.

[13] MESZAROS, Levente K., Anica DOSE, Stefano C.G. BIAGINI a Philip J. BLOWER. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorganica Chimica Acta* [online]. 2010, **363**(6), 1059-1069 [cit. 2018-01-02]. DOI: 10.1016/j.ica.2010.01.009. ISSN 00201693.

[14] ROSKOSKI, Robert. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [online]. 2007, **62**(3), 179-213 [cit. 2018-01-02]. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2007.01.006. ISSN 10408428.

[15] YOUSSEF, H., D. J. HICKLIN a E. K. ROWINSKY. Review: Monoclonal Antibodies to the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 in Cancer

Therapy. *Clinical Cancer Research* [online]. 2007, **13**(18), 5544s-5548s [cit. 2017-11-09]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1107. ISSN 1078-0432.

[16] ADAMS, Gregory P a Louis M WEINER. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology* [online]. 2005, **23**(9), 1147-1157 [cit. 2017-12-14]. DOI: 10.1038/nbt1137. ISSN 1087-0156.

[17] PANDEY, Manjari a Daruka MAHADEVAN. Monoclonal antibodies as therapeutics in human malignancies. *Future Oncology* [online]. 2014, **10**(4), 609-636 [cit. 2017-11-09]. DOI: 10.2217/fon.13.197. ISSN 1479-6694.

[18] APRILE, Giuseppe, Marta BONOTTO, Elena ONGARO, Carmelo POZZO a Francesco GIULIANI. Critical Appraisal of Ramucirumab (IMC-1121B) for Cancer Treatment: From Benchside to Clinical Use. *Drugs* [online]. 2013, **73**(18), 2003-2015 [cit. 2017-12-14]. DOI: 10.1007/s40265-013-0154-8. ISSN 0012-6667.

[19] CHIOREAN, E. G., H. I. HURWITZ, R. B. COHEN, J. D. SCHWARTZ, R. P. DALAL, F. E. FOX, L. GAO a C. J. SWEENEY. Phase I study of every 2- or 3-week dosing of ramucirumab, a human immunoglobulin G1 monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology* [online]. 2015, **26**(6), 1230-1237 [cit. 2017-12-14]. DOI: 10.1093/annonc/mdv144. ISSN 1569-8041.

[20] SPRATLIN, Jennifer L, Karen E MULDER a John R MACKEY. Ramucirumab (IMC-1121B): a novel attack on angiogenesis. *Future Oncology* [online]. 2010, **6**(7), 1085-1094 [cit. 2017-12-14]. DOI: 10.2217/fon.10.75. ISSN 1479-6694.

[21] CLARKE, Jeffrey Melson a Herbert I HURWITZ. Targeted inhibition of VEGF receptor 2: an update on ramucirumab. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. 2013, **13**(8), 1187-1196 [cit. 2018-01-03]. DOI: 10.1517/14712598.2013.810717. ISSN 1471-2598.

[22] APRILE, Giuseppe, Caterina FONTANELLA, Karim RIHAWI, Francesco GROSSI a Erika RIJAVEC. Ramucirumab: preclinical research and clinical development. *OncoTargets and Therapy* [online]. , 1997- [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.2147/OTT.S61132. ISSN 1178-6930.

[23] <https://vysetreni.vitalion.cz/spect/> (stránka navštívená 20.2.2018)

[24] SPRATLIN, Jennifer. Ramucirumab (IMC-1121B): Monoclonal Antibody Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2. *Current Oncology Reports* [online]. 2011, **13**(2), 97-102 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1007/s11912-010-0149-5. ISSN 1523-3790.

[25] GREEN, M.C., J.L. MURRAY a G.N. HORTOBAGYI. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treatment Reviews* [online]. 2000, **26**(4), 269-286 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.1053/ctrv.2000.0176. ISSN 03057372.

[26] Charron M, Beyer T, Bohnen NN, et al. Image analysis in patients with cancer studied with a combined PET and CT scanner. *Clin Nucl Med*. 2000;**25**:905–910.

[27] Karczmarczyk Urszula, Markiewicz Alina, Mikołajczak Renata, Lisiak Emil, Bilski Marek, Pietrzykowski Jacek and Michalik Joanna. ^{99m}Tc human IgG radiolabelled by HYNIC. Biodistribution and scintigraphy of experimentally induced inflammatory lesions in animal model, *Nucl. Med. Rev* 2004;**7**(2):107-112, ISSN 1506–9680

[28] Powsner Rachel A., Powsner Edward R. *Essential Nuclear Medicine Physics*. Massachusetts, USA, Blackwell Publishnig, Inc., 2006. ISBN-13: 978-1-4051-0484-5.

[29] REILLY, Raymond. *Monoclonal antibody and peptide-targeted radiotherapy of cancer*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010. ISBN 978-0-470-24372-5.

[30] Nový 2014, Klener a Klener 2010, Jílek 2008, Sobotková a Bartůňková 2008

[31] SPRATLIN, Jennifer L., Roger B. COHEN, Matthew EADENS, et al. Phase I

Pharmacologic and Biologic Study of Ramucirumab (IMC-1121B), a Fully Human Immunoglobulin G 1 Monoclonal Antibody Targeting the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2010, **28**(5), 780-787 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.7537. ISSN 0732-183X.

[32] VACCHELLI, Erika, Jonathan POL, Norma BLOY, et al. Trial watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies for oncological indications. *OncoImmunology* [online]. 2015, **4**(1), e985940- [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.4161/2162402X.2014.985940. ISSN 2162-402X.